

翻訳伸長停滞に起因するmRNA・タンパク質品質管理機構の分子機構解析

著者	池内 健
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17520号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121266

博士学位論文

翻訳伸長停滞に起因する mRNA・タンパク質
品質管理機構の分子機構解析

東北大学大学院薬学研究科
生命薬科学専攻 遺伝子制御薬学分野

B4YD1014

池内 健

目次

要旨	．．．．． 3
第 1 章 序論	．．．．． 7
1-1 RNA 品質管理機構	．．．．． 11
1-2 mRNA 品質管理に共役するタンパク質品質管理機構	．．．．． 19
1-3 翻訳アレストと翻訳伸長阻害	．．．．． 22
1-4 ユビキチン化の機能	．．．．． 25
第 2 章 翻訳伸長停滞に起因する新生鎖品質管理機構 Ribosome-associated quality control における E3 ユビキチン化酵素 Hel2 の機能解析	．．．．． 31
2-1 序論	．．．．． 33
2-2 目的	．．．．． 42
2-3 結果	．．．．． 42
2-4 考察	．．．．． 58
第 3 章 翻訳伸長停滞に起因する mRNA 品質管理機構 No-go decay における E3 ユビキチン化酵素 Hel2 の機能解析	．．．．． 63
3-1 序論	．．．．． 65
3-2 目的	．．．．． 69

3-3 結果	・ ・ ・ ・ 69
3-4 考察	・ ・ ・ ・ 82
第 4 章 終止コドンを持たない mRNA の分解機構 Nonstop mRNA decay の分子機構解析	・ ・ ・ ・ 87
2-1 序論	・ ・ ・ ・ 89
2-2 目的	・ ・ ・ ・ 96
2-3 結果	・ ・ ・ ・ 96
2-4 考察	・ ・ ・ ・ 107
第 5 章 材料と実験方法	・ ・ ・ ・ 113
4-1 出芽酵母株	・ ・ ・ ・ 115
4-2 プラスミド	・ ・ ・ ・ 115
4-3 実験方法	・ ・ ・ ・ 115
参考文献	・ ・ ・ ・ 127
表	・ ・ ・ ・ 141
図	・ ・ ・ ・ 147
謝辞	・ ・ ・ ・ 198
副論文	・ ・ ・ ・ 199

要旨

【研究背景・目的】

DNA が保持する遺伝子情報は、核内で RNA に転写され、様々な成熟化過程を経た後、細胞質においてリボソームによって翻訳されることでタンパク質として発現する。遺伝性変異や体細胞変異によって遺伝子に変異が生じると、その情報は異常な mRNA として転写され、最終的に正常な機能を持たない、あるいは異なる機能を保持した異常タンパク質を発現する危険性を保持する。細胞は正確な遺伝子発現を履行するため、様々な異常 mRNA および異常タンパク質を認識し分解する品質管理機構を保持している。近年、同じアミノ酸をコードする同義コドン間において翻訳効率の顕著な差異があることが明らかになり、同義コドン置換変異(サイレント変異)に起因する疾患例も報告された。分子機構として、コドン選択と mRNA 安定性およびタンパク質フォールディングの相互関係が明らかになりつつあり、翻訳の、特に伸長段階における様々な制御機構の重要性が示唆されている。

翻訳伸長段階において翻訳反応の停滞が生じると、1)途中まで合成された短鎖型の新生タンパク質が Ribosome-associated quality control (RQC) 機構により、プロテアソーム依存的に分解を受ける。また、2)停滞したリボソームの近傍で mRNA が分子内切断され、その後エキソヌクレアーゼによる迅速な分解を受ける No-go decay (NGD)が引き起こされることが明らかにされている。しかし、これらの品質管理機構は、対象となる停滞したリボソームの認識・選別機構に関して、分子機構が未だ明らかにされていない。本研究では、翻訳伸長停滞に起因する2つの品質管理機構を惹起する分子メカニズムの解明を目的として、出芽酵母を用いた解析を行なった。

【結果・考察】

(1) Ribosome-associated quality control (RQC) 機構の惹起機構の解明

RQC 機構では、翻訳伸長停滞したリボソームのサブユニット解離後、60S サブユニット上に形成される RQC 複合体を介して、途中まで合成された短鎖型新生ペプチド鎖をポリユ

ビキチン化し分解を誘導する。しかし RQC 惹起に必須な、翻訳伸長停滞したリボソームの認識機構、およびリボソームのサブユニット解離機構は、これまで明らかにされていなかった。そこで、停滞したリボソームを識別する分子が存在すると考え、出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニングにより同定した、E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 に着目し機能解析を行なった。本研究における遺伝学的・生化学的解析から Hel2 は、リボソームに結合すること、および、翻訳伸長停滞に起因する 2 つの品質管理機構 NGD と RQC の惹起に必須であることを明らかにした。Hel2 はリボソーム上でユビキチン化を介して RQC 機構を惹起すると考え、質量分析器を用いて Hel2 のユビキチン化基質の探索を行なった。その結果、リボソーム 40S サブユニットタンパク質 Rps20 が Hel2 依存的にユビキチン化されることを発見した。さらに、質量分析により決定した Rps20 のユビキチン化残基 K6 および K8 を、リジン残基からアルギニン残基に置換した、ユビキチン化を受けない出芽酵母変異株を作製し解析したところ、この変異体では RQC が惹起されないことを見いだした。この結果は *hel2* 欠損株の場合と全く同様であった。実際に Hel2 がリボソーム上で Rps20 を直接ユビキチン化し得るか評価するため、リボソームの試験管内ユビキチン化反応系を新規に構築した。解析の結果、Hel2 がリボソーム上で Rps20 の K6 および K8 を直接ユビキチン化することを確認した。以上の結果から、Hel2 は停滞したリボソームの Rps20 を選択的にユビキチン化し、このユビキチン化が RQC のトリガーとなることを明らかにした。

Hel2 は翻訳伸長停滞したリボソームの認識に関与する分子であると考えられる。一方で、終止コドンを持たない mRNA や、mRNA の分子内切断によって生じる 5'側の中間産物であるランケート mRNA の 3'末端で停滞したリボソーム由来の品質管理機構には関与しない。そこで、Hel2 はどのような状態の停滞リボソームを認識するのかに関して明らかにするために解析を行なった。当研究室とミュンヘン大学 Beckmann 研究室との共同研究により、Hel2 と共精製したリボソームのうち 77.6%が *rotated state* であることが示された。また、*rotated state* でリボソームを停滞させる翻訳伸長阻害剤アニソマイシンの感受性を評価したところ、*hel2* 欠損株および *rps20-K6R/K8R* 変異株はアニソマイシン感受性であつ

た。さらに、UC Berkeley の Ingolia 研究室とのリボソームプロファイリングの共同研究により、翻訳停滞配列であるレアコドンクラスターにおいて、通常より短い 21-23 塩基の footprint が多く観察され、リボソームが特殊な状態で停滞することを発見した。これはアニソマイシンを処理したリボソームの場合と同様の結果であった。以上の結果から、Hel2 は rotated state で停滞したリボソームを特異的に認識し、Rps20 をユビキチン化することで RQC を惹起している可能性が強く示唆された。

本研究成果は、異常タンパク質の発現抑制メカニズムを理解する上で重要な分子機構を明らかにしており、今後のヒトや哺乳類における研究の分子基盤となると期待している。

(2) No-go decay (NGD)の分子機構の解明

mRNA品質管理機構(NGD)では、翻訳伸長の停滞をトリガーとして、停滞したリボソームの近傍でmRNAが分子内切断される。その後、2つの切断片はexosomeおよびXrn1エキソヌクレアーゼにより迅速に分解される。本機構においても、RQCと同様に、停滞したリボソームの認識機構は明らかにされておらず、また、mRNAの分子内切断を担うエンドヌクレアーゼも同定されていない。

そこでmRNA分子内切断に必須な分子を探索するため、RQC機構の惹起段階において、停滞したリボソームの認識に必須なE3ユビキチンリガーゼHel2の機能解析を行なったところ、Hel2はmRNA分子内切断に必須であることがわかった。一方で、RQCの惹起に必須なRps20のユビキチン化は、mRNA分子内切断には必須でないことが明らかになった。また、Hel2のドメイン解析を行なった結果、RQCの惹起およびRps20のユビキチン化に必須なHel2 C末ドメインが、NGDの惹起には不要であった。しかし、Hel2のRING-fingerドメインおよびE2ユビキチン結合酵素Ubc4はmRNA分子内切断に必須であることから、RQCとは別の基質をユビキチン化することで、mRNA分子に切断を誘導する可能性が示唆された。

ポリA鎖の翻訳や連続したレアコドン配列、mRNAの二次構造などによって引き起こされる翻訳伸長停滞に起因してmRNA分子内切断が惹起されることは既に明らかにされていたが、実

際の細胞内では、細胞内環境やストレス等によって引き起こされる翻訳停滞も、同様にmRNA分子内切断が惹起されることが想定された。本研究では、必須アミノ酸欠乏時に、対応するアミノアシルtRNAの細胞内濃度が低下することに着目し、特定のコードンでリボソームが停滞することで、mRNA分子内切断を引き起こすか否かを検証した。その結果、トリプトファン欠乏時に、mRNAのトリプトファンコードン近傍においてmRNAが分子内切断されることを見いだした。またこの分子内切断にHel2が必須であることが明らかになった。また、*hel2*欠損株は翻訳伸長阻害剤であるanisomycinに感受性を持つことから、Hel2による停滞したリボソームの認識は、細胞恒常性を担保する上で重要であることが明らかになった。

第 1 章

序論

第 1 章 序論

DNA が保持する遺伝情報は、核内において RNA ポリメラーゼによって転写され、スプライシングやポリ A 鎖付加等の様々な RNA 成熟化過程を経た後、mRNA として細胞質に輸送される。mRNA が保持する遺伝情報は細胞質において、リボソームによって翻訳されることでタンパク質へと変換され、様々な生命機能に寄与する。この遺伝情報の伝達・発現過程をセントラルドグマと呼び（図 1-1）、正確な遺伝子発現を行なうことは生物において極めて重要であると言える。

遺伝性変異や体細胞変異によって DNA 上の遺伝情報に変異が生じると、変異を有する mRNA が産生され、最終的に正常な機能を持たない、すなわち機能欠損型や機能獲得型の異常タンパク質が発現しうる。また遺伝子発現において mRNA は、複雑かつ巧妙な過程（DNA からの転写による mRNA 前駆体の合成、核内プロセッシング、細胞質への輸送と細胞内の特定区画への局在、翻訳）を経るが（図 1-1）、これらの過程はしばしばミスを生じ、異常 mRNA および異常タンパク質を生成する可能性がある。細胞は遺伝子発現の正確性を保証するため、様々な成因によって生じた異常 mRNA、異常タンパク質を識別して分解する「品質管理機構」を保持している。

本研究では、“翻訳”に共役した mRNA・新生タンパク質品質管理機構に焦点を当て、分子機構の解明を通して、正確な遺伝子発現制御機構の包括的理解を目指した（図 1-2）。現在までに発見されている主要な mRNA 品質管理機構として、1)DNA のナンセンス変異によって、本来の終止コドンよりも上流に異常な終止コドン(premature termination codon : PTC)を持つ mRNA を分解する、**NMD** (nonsense-mediated mRNA decay : ナンセンス変異依存分解系)(Kervestin and Jacobson, 2012)、2)スプライシングエラーやポリ(A)付加反応のエラーなどによって終止コドンを欠失した異常 mRNA を分解する、**NSD** (nonstop mRNA decay : ノンストップ mRNA 特異的分解系)(van Hoof et al., 2002; Inada and Aiba, 2005)、3)翻訳伸長反応の中途停滞に起因する mRNA 分解系 **NGD** (no-go

decay)(Doma and Parker, 2006) がある。また、これらの mRNA 品質管理機構に共役して起こる新生タンパク質品質管理機構として、1)ナンセンス変異を持つ mRNA を翻訳することで生じた短鎖型異常タンパク質の分解系である **NMPD** (nonsense-mediated protein degradation)(Kuroha et al., 2009, 2013)、2)ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質、および翻訳伸長停滞によって生じた短鎖型タンパク質の分解系である **RQC** (Ribosome-associated quality control)(Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman et al., 2012)が存在する。

本論文の第 2 章では、翻訳伸長停滞によって生じた短鎖型タンパク質の分解系 **RQC** のトリガーとなる、翻訳伸長停滞したリボソームの認識機構の解明を目的として、出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニングにより同定した新規品質管理因子 Hel2/Rqt1 に着目して解析した研究結果を論述した。また第 3 章では、同じく翻訳伸長停滞に起因する mRNA 側の品質管理機構である **NGD** における Hel2/Rqt1 の機能解析に関して研究結果を論述した。

第 4 章では、終止コドンもポリ A 鎖も持たない切断型(トランケート) mRNA 分解機構、およびトランケート mRNA を翻訳することで産生される異常タンパク質の分解機構における、リボソーム 40S サブユニットタンパク質 Asc1/RACK1 の機能解析結果を論述した。また、同機構におけるリボソーム解離因子 Dom34/Pelota および Hbs1/Hbs1L の酵母-ヒト間の機能保存性と特異性に関して解析した研究結果を合わせて論述した。

なお序論では第 2 章以降に先立ち、本論文の礎となる知見として RNA 品質管理機構および mRNA 品質管理機構に共役して起こるタンパク質分解機構に関して記述した。また、第 2 章および第 3 章において、翻訳伸長停滞(翻訳アレスト)に伴う品質管理機構およびユビキチン化による制御機構について論述するため、これらに関しても合わせて記述した。

1-1. mRNA 品質管理機構

1-1-1. NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay)

DNA のナンセンス変異によって、通常の終止コドンよりも上流に未成熟終止コドン (PTC; premature termination codon) をもつ mRNA の品質管理機構である。ORF の途中、すなわち通常よりも手前で翻訳終結が起きることを認識し mRNA 分解を引き起こす NMD は、スプライシング有無の観点から 2 種類のモデルに大別される。1) スプライシングおよび EJC に依存した NMD モデル (図 1-3) (Bühler et al., 2006; Kashima et al., 2006)、および 2) 通常より長い 3'-UTR を識別するスプライシング非依存の NMD モデル (図 1-4) (Amrani et al., 2004)、である。

1) スプライシングおよび EJC に依存した NMD は哺乳類において保存されている。本機構では、遺伝子発現において mRNA の多様性を獲得する上で重要な成熟化過程であるスプライシングが、PTC の認識に重要な役割を果たしており、スプライシングの結果 mRNA 上のエクソン-エクソン結合部上流に形成される複合体 (EJC; exon-exon junction complex) に依存して NMD が引き起こされる。正常な mRNA を翻訳する場合、新規産生された mRNA にとって初めての翻訳 (パイオニアラウンド翻訳) の際に、リボソームが mRNA 上に結合する EJC を解離させる。一方で、PTC を持つ mRNA を翻訳する場合、PTC より下流に位置する EJC は mRNA から解離せずにとどまる。このような状況において PTC 上で翻訳終結反応が起こると異常翻訳終結と認識され、NMD が引き起こされる (図 1-3)。実際、一部の例外を除き、ほぼ全ての mRNA において本来の終止コドンを含むエクソンは最終エクソンであるため、下流に EJC は存在せず NMD は惹起されない。つまり EJC が下流に存在する状況下での翻訳終結がトリガーとなり、以下に示す NMD の一連の反応が誘発される。まず PTC 上のリボソームに翻訳終結因子 eRF1-eRF3 に加えて、NMD 因子の Upf1、および Upf1 リン酸化酵素である SMG1 が結合し SURF (SMG1-Upf1-eRF1/3) 複合体を形成する。次に PTC の下流に存在する EJC 上で Upf2-Upf3 と SURF 複合体が相互作用することで DECID (Decay inducing)

複合体が形成され、Upf1 が SMG1 によってリン酸化される。このリン酸化反応が NMD に必須であり (Kashima et al., 2006)、リン酸化タンパク質結合ドメインである 14-3-3 様ドメインを持つ PIN 型 mRNA 分子内切断酵素(エンドヌクレアーゼ) SMG6 と、同じく 14-3-3 様ドメインを持つ SMG5-SMG7 がリン酸化された Upf1 を認識して結合し、最終的に mRNA の分解を引き起こす。

一方で、出芽酵母や無脊椎動物における NMD は、2) スプライシング非依存の NMD であり PTC の識別にスプライシングは関与しない、すなわち EJC を必要としない(図 1-4)。また高等真核生物においても、最終エクソン内に生じた PTC のように下流に EJC が存在しない場合であっても NMD を受ける例が報告されており (Bühler et al., 2006)、EJC モデルの例外となる PTC 識別機構は依然として未解明な問題である。PTC と正常な終止コドン进行を識別する上での両者の違いは、mRNA 上での相対的な位置であり、mRNA の 3'末端からの距離は PTC の方が相対的に長くなる。すなわち相対的に長い 3'-UTR を持つ mRNA は異常であると識別され NMD を受けるモデルが提唱されている (Amrani et al., 2004; Muhlrads and Parker, 1999)。この相対的距離を識別する因子のひとつに mRNA のポリ A 鎖に結合するポリ A 結合タンパク質 (PABP) がある。PABP は翻訳終結時に翻訳終結因子 eRF3 と直接結合するが、この PABP を PTC のすぐ下流に繫留すると、mRNA が安定化することが示されている (Behm-Ansmant et al., 2007)。また NMD においては NMD に必須な因子 Upf1 が eRF3 と結合することから、PTC での翻訳終結時に eRF3 と PABP との相対的距離が遠い場合、効率的に Upf1 が eRF3 と結合することで、NMD が惹起されると考えられている。

NMD は遺伝性疾患とも密接に関わっていることから、そのメカニズム解明は新薬開発の重要な基盤となっている。実際に、ヒト遺伝性疾患となる責任遺伝子の変異のうち 5-70% が ORF 内のナンセンス変異であることが報告されている (Auld et al., 2009)。例えば、紫外線感受性疾患の一つである色素性乾皮症 A 群 (XPA) では、日本人患者の 8 割に同じナンセンス変異が見いだされる (Tanaka et al., 1990)。患者(ホモ接合体)の出

現頻度から推察される XPA 原因遺伝子ナンセンス変異の保因者は 113 人に 1 人と考えられており、その変異は両親が保因者の場合に子供が発症する確立は 1/4 である。また、遺伝性疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー症では、*Dystrophin* 遺伝子にナンセンス変異やエクソン欠失によるフレームシフトが生じることで、ORF 中に PTC が出現し NMD が生じる結果、筋骨格組織に必要なタンパク質がほとんど合成されなくなる (Hoffman et al., 1990)。*dystrophin* 遺伝子に関してはエクソン数が多く、また *dystrophin* タンパク質は一部が欠失しても、骨格筋形成に十分な点から、エクソンスキッピング法を用いた新薬開発が国内外で積極的に行われている。エクソンスキッピング法では、読み飛ばしたいエクソンに対するアンチセンス核酸を使用し、pre-mRNA の対応するエクソンにアンチセンス核酸を結合させることで、当該エクソンをスプライシングにより排除する。この方法により PTC が出現しないようにフレームを人為的に操作し、NMD を回避することで、機能を持つ *dystrophin* タンパク質の産生を促す。現在までに、Sarepta Therapeutics のエクソン 51 スキップ薬(EXONDYS 51™)が米国医薬品局の承認を受けている。また、日本新薬株式会社のエクソン 53 スキップ薬(NS-065/NCNP-01)が日本および米国で臨床試験段階である。

また、当研究室による解析によって PTC を持つ mRNA から合成された短いタンパク質もまた、mRNA 同様に分解されることが明らかになった。PTC 由来タンパク質分解機構(NMPD; nonsense-mediated protein degradation)には Upf1 が関与し、異常タンパク質はプロテアソームによる分解を受けることが明らかになっている(Kuroha et al., 2009, 2013)。詳細は後述する。

1-1-2. NSD (NonStop mRNA Decay)

NSD は終止コドン欠失した異常ノンストップ mRNA を分解する機構であり、酵母からヒトまで保存されている。ノンストップ mRNA は終止コドンからセンスコドンへの変異によっても稀に生じるが、多くの場合 3'-UTR 配列内に inframe で複数個の終

止コドンを含むため、ノンストップ mRNA とはならない。実際には、ORF 途中に存在するポリ A 鎖付加シグナル様配列によって、転写段階においてポリ A 鎖付加反応のエラーが生じた場合に産生される、ORF 内にポリ A 鎖が付加されたノンストップ mRNA を選択的に分解していると考えられる(Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002)。例えば cDNA データベース EST(expressed sequence tag)に登録されている酵母全 cDNA のうち約 1%が遺伝子コード領域内にポリ(A)鎖が付加されたノンストップ mRNA 由来であることが明らかにされている(Graber et al., 1999)。このように NSD は、遺伝情報発現過程の“不正確性”を補う機構である、と考えられる。

また、mRNA が ORF 途中で切断を受けた場合などに生じる、終止コドンもポリ A 鎖も持たないランケート mRNA も広義のノンストップ mRNA に含まれ、NSD による分解を受ける(Tsuboi et al., 2012)。ランケート mRNA は主に mRNA の分子内切断によって産生される。例えば NMD において、SMG6 によって切断されてできた 5' 側中間産物や、siRNA 処理によって切断された 5'側中間産物などが考えられる。

NSD の分子機構モデルは、出芽酵母を用いた研究から 3'末端に停滞した 80S リボソームが、G タンパク質 Ski7 の C 末端ドメインによって認識されるモデルが提唱された(Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002)(図 1-5)。Ski7 の C 末端ドメインは、翻訳伸長因子 (eEF1A)、翻訳終結因子(eRF3)に見られる GTPase ドメイン様の構造をとることが知られている(Kowalinski et al., 2015)。また、Ski7 の N 末端ドメインは Ski2-3-8-8 ヘテロ複合体およびエキソヌクレアーゼであるエキソソームと結合することから、エキソソームをリクルートすることで 3'→5'方向の効率的な分解に寄与すると考えられる。しかし、Ski7 は酵母には存在するが、ヒトを含む高等真核生物には保存されていない。

また NSD では、Ski7 非依存的に 5'→3'方向の分解も生じる。ポリ A 鎖を持つ mRNA は通常ポリ A 鎖結合タンパク質 PABP がポリ A 鎖に結合し、mRNA の 5'キャップ構造には翻訳開始因子 eIF4E が結合する。eIF4E に結合する翻訳開始因子 eIF4G は

PABP と結合し、mRNA の環状構造(クローズドループ構造)を形成することで、mRNA を安定化し翻訳を促進する。ノンストップ mRNA の場合、リボソームがポリ A 鎖まで翻訳するため、ポリ A 鎖に結合している PABP がポリ A 鎖上から解離し、mRNA のクローズドループ構造が解消される。結果として、Dcp1-2 による 5'キャップ構造の除去(デキャッピング)が起こり、Xrn1 エキソヌクレアーゼによる 5'→3'方向の分解が促進される。

本研究室では、ノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームのサブユニット解離に伴う NSD モデルを提唱した(Tsuboi et al., 2012)(図 1-5)。tRNA 擬態タンパク質 Dom34/Pelota と Ski7 のパラログである G タンパク質 Hbs1/HBS1L が、Dom34-Hbs1 複合体として、ノンストップ mRNA の 3'末端にて停滞したリボソームの空の A サイトを認識して結合することで、Rli1/ABCE1 をリクルートしリボソームサブユニット解離を促進するモデルである。X 線結晶構造解析と極低温電子顕微鏡構造解析によって、Dom34/Pelota は tRNA や eRF1 に類似の構造を取り、リボソーム A サイトに入ることが明らかにされた (Becker et al., 2011; Chen et al., 2010; Hilal et al., 2016; Kobayashi et al., 2010; Shao et al., 2016)。Dom34/Pelota はリボソーム A サイトのデコーディング領域と相互作用しており、A サイトに mRNA が無い場合に結合できると考えている。しかし、*in vitro*においては A サイトに mRNA が存在するリボソームを基質として Pelota-HBS1L の結合実験に用いた場合においても、A サイトの mRNA を排除して結合することが明らかにされており、実際に *in vivo*において空の A サイトのみに結合するのか、mRNA が存在しても結合できるのかは証明されていない(Shao et al., 2016)。また Hbs1 は Ski7 と同様に GTPase 活性ドメインを保持し、Dom34 の A サイトでの構造変換に関与すると考えられている。ヒトを含む高等真核生物においては HBS1L に加えて、G タンパク質の GTPBP1 および GTPBP2 も Pelota と相互作用することが報告されており、GTPBP2 は停滞したリボソームの解消および神経細胞死の回避に必須であることが明らかにされている(Ishimura et al., 2014)。以上に述べた様

に Dom34-Hbs1 はノンストップ mRNA 上で停滞したリボソームのサブユニットへの解離に重要であり、リボソームの解離がエキソソームによる 3'→5'方向のノンストップ mRNA 分解に必須である。すなわち Dom34-Hbs1 がノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームの解離を促進し、Ski7 は Ski2-3-8 複合体および Exosome のリクルートに関与すると考えられる。

終止コドンを欠失したトランケート mRNA は、後述する NGD においても産生される(Ikeuchi and Inada, 2016; Tsuboi et al., 2012)(図 1-6)。NGD により分子内切断された後に産生される 5'側中間産物は 5'側にキャップ構造を持つが終止コドンとポリ A 鎖を持たない mRNA となりうる。真核生物では一つの mRNA を複数のリボソームが翻訳することでポリソーム構造を形成するため、先頭のリボソームによって引き起こされた NGD の直後では後続のリボソームが 5'側中間産物上を走査している。すなわち後続のリボソームによって NSD が誘発され、5'側中間産物は Dom34-Hbs1 依存に分解を受ける(Tsuboi et al., 2012)。終止コドンを欠失したトランケート mRNA は出芽酵母以外においても産生される。NMD において SMG6 によって切断された 5'側 mRNA 分解中間産物や、siRNA や dsRNA 等の処理によって RNAi により切断された 5'側 mRNA 分解中間産物としても生じ、これらのトランケート分解にも Pelota/Hbs1L が関与することが報告されている(Hashimoto et al., 2017)。

1-1-3. NGD (No-Go Decay)

翻訳伸長停滞に起因する mRNA 分解機構である NGD は、ORF の途中に強固な RNA 高次構造を挿入したレポーター mRNA を用いた実験により発見された(Doma and Parker, 2006)。NGD は既に報告されている 2 つの品質管理機構; NMD, NSD とは異なり翻訳伸長の異常に起因する。品質管理機構のトリガーは mRNA 側の異常のみならず、細胞が受ける酸化ストレスやアミノ酸・tRNA 枯渇環境、翻訳伸長阻害剤の投与等によっても誘導されると考えられる。NGD の一連の機構は、まず停滞したリボソームの近傍で、

未知のエンドヌクレアーゼが mRNA の分子内切断を行うことで開始される(図 1-6)。分子内切断によって生じた 2 つの mRNA 断片は、3'→5'方向に RNA を分解するエキソソーム(Exosome)と、5'→3'方向に RNA を分解する Xrn1 エキソヌクレアーゼによって迅速分解される。NGD による mRNA 分解は、細胞質中に形成される RNA 分解酵素を含む P-body という構造体が関与する(Doma and Parker, 2006)。また、NGD はステムループ構造のみならず、Pseudo-knot や G-quadruplex などの安定な mRNA 高次構造や、レアコドンクラスターなどの極端に翻訳し難い配列(Chen et al., 2010)、当研究室で発見した、ポリ A 配列などの連続した塩基性アミノ酸配列をコードする配列(Kuroha et al., 2010)などのシス配列の翻訳により誘導されることが明らかにされている。また NGD は、種々の翻訳伸長阻害剤の処置や、次項に述べる NRD を引き起こすリボソーム等による、翻訳伸長阻害によっても惹起されると考えられるが、mRNA 上の特定の場所で切断される状況ではないため、分子内切断産物の検出には至っていない(Cole et al., 2009)。

前項で述べた翻訳終結因子に構造的類似性をもつ Dom34-Hbs1 複合体は元々ステムループ構造に起因する NGD に必須な分子として同定された。しかし、レアコドンクラスターのような強い停滞能を持つ配列に起因する NGD では Dom34-Hbs1 は必須ではなく、停滞したリボソームの認識から mRNA 分子内切断に至るまでの責任分子は全く明らかにされていない(Chen et al., 2010)。

NGD の分子機構を考える上で最も重要なプロセスは mRNA 分子内切断であるが、切断を担うエンドヌクレアーゼが明らかにされていない。NGD では翻訳伸長停滞に伴って、Dom34-Hbs1 複合体がリボソーム A サイトに入り mRNA 分子内切断を促進すると考えられてきた(Doma and Parker, 2006; Tsuboi et al., 2012)(図 1-2、1-3)。in vitro の実験によって Dom34 ドメイン I にエンドヌクレアーゼ活性があることが報告された(Lee et al., 2007)が、in vivo では出芽酵母 *dom34* 欠損株においても依然として mRNA 分子内切断が観察されることから、少なくとも in vivo においては、Dom34 が NGD におけるエンドヌクレアーゼである可能性は低い(Tsuboi et al., 2012)。近年、Dom34 は in vitro においてリ

ボソームのサブユニット解離活性をもつことが報告された(Shoemaker et al., 2010)。さらに当研究室による先行研究において Dom34:Hbs1 は *in vivo* においてノンストップ mRNA の 3'末端で翻訳停滞したリボソームのサブユニット解離を行なう因子であることを明らかにし、mRNA 分子内切断には直接関与していない可能性が示唆された(Tsuboi et al., 2012)。Dom34:Hbs1 複合体と非依存に働くエンドヌクレアーゼが存在する、もしくは、リボソーム自身が mRNA を切断している可能性が推測されているが、その分子・機能の同定には至っていない。

NGD は NMD や NSD と比較して分子機構の基礎研究およびヒトの疾病との関連研究が進んでいない。NMD は前述のように筋ジストロフィー症を始めとした、ナンセンス変異に伴う遺伝性疾患と密接に関与しているため、ヒトにおいて非常によく研究が進んでいる。NSD はその普遍性から、近年ヒトを含む高等真核生物における研究が進んでおり(Saito et al., 2013)、終止コドン欠失変異に伴う遺伝病の原因として REMD (ribosome extension-mediated mRNA decay)、および 3'-UTR 由来配列を持つ異常タンパク質分解機構とともに注目されている(Inada and Aiba, 2005; Kong and Liebhaber, 2007; Shibata et al., 2015)。一方で NGD は、出芽酵母および試験管内反応系を用いた研究により分子機構の解析が行われているが、現在までに NGD に必須な因子は報告されていない。近年出芽酵母の内在 mRNA がトランス二重鎖形成した際に NGD による制御を受けることが発見された(Sinturel et al., 2015)。また、遺伝性血管浮腫の原因遺伝子 *SERPING1* のスプライシングサイトの変異によって mRNA が高次構造を形成し、NGD による分解を受ける可能性が報告されている(Colobran et al., 2014)。しかし NGD そのものの分子機構に不明な点が多く、一歩踏み込む詳細な研究は進んでいない現状にある。

1-1-4. NRD (Nonfunctional Ribosomal RNA Decay)

NRD は mRNA ではなくリボソーム RNA(rRNA)の品質管理機構である。rRNA に変異が生じ、翻訳開始または伸長に欠損を持つ場合に、翻訳伸長の停滞に伴って rRNA が分

解される品質管理機構である(Cole et al., 2009; Lariviere et al., 2006)。NRD はその特徴から 2 種類の機構が存在する。1)リボソーム 60S サブユニットを構成する 25S rRNA 分解系(25S NRD)、2)リボソーム 40S サブユニットを構成する 18S rRNA 分解系(18S NRD)。

25S NRD ではペプチド鎖転移活性中心(peptidyl transferase center; PTC)に変異を持つ 25S rRNA が翻訳依存に分解される。変異 25S rRNA を含むリボソームはペプチド鎖転移活性を持たないため、翻訳開始直後に翻訳伸長阻害を引き起こす。その後 SCF 型 E3 ユビキチンライゲース複合体ある GUARD complex 依存的にリボソームタンパク質がユビキチン化受け、Cdc48-Npl4-Ufd1 複合体に依存してリボソームサブユニット解離およびプロテアソームによる 60S リボソームタンパク質の分解が生じる(Fujii et al., 2009, 2012)(図 1-7)。その後むき出しとなった 25S rRNA が分解を受けると考えられている。リボソームの合成には多大なエネルギーを必要とすることから、正常な 40S サブユニット側は分解されずリサイクルされ则认为られている。

18S NRD では A サイトのコドン認識部位(decoding site)に変異を持つ 18S rRNA が翻訳依存的に分解を受ける。18S NRD は Dom34:Hbs1 や Ski7、Exosome および Xrn1 といった NGD-NSD と同じ因子によって分解制御を受けることが分かっている(図 1-7)。また、18S NRD では NGD と同様に細胞質の RNA 分解の場である P-body において異常 rRNA が分解を受ける(Cole et al., 2009)。

以上のように rRNA 品質管理機構は翻訳前ではなく翻訳開始時もしくは伸長時に行われる。また、NRD は NGD と同様に翻訳伸長阻害に起因する品質管理機構であり 18S NRD では Dom34-Hbs1 が関与することも明らかにされていることから、NRD を引き起こすリボソームにおいて NGD も同時に生じている可能性が示唆されている(van den Elzen et al., 2010)。

1-2. mRNA 品質管理に共役するタンパク質品質管理機構

異常 mRNA から産生されるタンパク質（新生ペプチド鎖）も mRNA と同様に分解機

構の存在が明らかにされてきた。NMD の標的となる PTC を持つ mRNA や NGD を引き起こす mRNA は翻訳されることで通常より短い不完全長タンパク質を産生する。またノンストップ mRNA では、通常翻訳されないポリ A 鎖が翻訳されることで生じる高塩基性のポリリジン鎖を保持した異常タンパク質が産生される。これらの異常タンパク質は細胞に悪影響を与えうる。細胞は異常 mRNA のみならず、異常タンパク質を分解する機構も備えている。

1-2-1. NMPD (Nonsense-mediated protein degradation)

NMD の標的となる PTC を持つ mRNA は、翻訳されることで通常より短い不完全長タンパク質を産生する。不完全長タンパク質は酵素活性部位や他の分子との結合部位を欠くことによる機能欠損や恒常活性化、degron 配列を欠失することによる安定化や凝集を引き起こす危険性を孕む。そのため細胞は NMD に共役したタンパク質分解機構を保持していると考えられる。出芽酵母における NMPD は NMD と同様に、Upf1 による制御を受けること、長い 3'-UTR 配列を認識して分解されること等共通点が多い。さらにペプチド鎖はユビキチン化されることが必要であり、プロテアソームによる分解を受けることを明らかにしている(Kuroha et al., 2009)。しかし PTC を持つ mRNA 由来のタンパク質ならば必ず NMPD を受けるわけではなく、産生されたタンパク質のフォールディングに異常がない場合は分解を受けない。また、ヒトにおいては NMPD 機構は報告されておらず、分解を受けるか否かは個々のタンパク質の安定性に委ねられていると考えられている。近年、タンパク質の N 末のアミノ酸残基がそのタンパク質の半減期を左右する法則 N-end rule の認識分子(recognin)として働くユビキチンライゲース複合体 Ubr1-Rad2 が NMPD に関わる因子として報告された(Bartel et al., 1990; Verma et al., 2013)。また、当研究室によって Upf1 以外にシャペロン因子 Hsp70 および Sse1 が分解に関与すること、新生タンパク質のフォールディング異常が分解に重要であること等が示唆されている(Kuroha et al., 2009, 2013)(図 1-8)。

1-2-2. RQC (Ribosome-associated Quality Control)複合体を介した新生ペプチド鎖分解機構

ノンストップ mRNA 由来タンパク質の分解機構の存在はノンストップ mRNA 分解機構 NSD の解析の過程で発見され、ノンストップ mRNA 由来のタンパク質がプロテアソーム依存的に分解されることが明らかにされた(Ito-Harashima et al., 2007)。その後、神経変性様症状を呈すマウスの責任遺伝子として順遺伝学によって発見された E3 ユビキチンライゲース Ltn1/Listerin が、60S リボソームに結合し新生ペプチド鎖のユビキチン化を行なうことが明らかにされた(Bengtson and Joazeiro, 2010; Chu et al., 2009)。その後 Ltn1 と同じく 60S リボソームに結合し、ノンストップもしくは翻訳伸長停滞由来の異常タンパク質分解に関与する因子として、Rqc1 と Rqc2/Tae2 が同定され、Ltn1-Rqc1-Rqc2 が結合した 60S リボソーム-新生鎖複合体が RQC 複合体と名付けられた (Brandman et al., 2012)(図 1-9)。RQC 複合体上で Ltn1 はペプチジル tRNA の状態の新生ペプチド鎖をユビキチン化し、ユビキチン化されたペプチド鎖は AAA-ATPase 複合体の Cdc48-Npl4-Ufd1 によって 60S サブユニットから引き抜かれ、最終的にプロテアソームによる分解を受けることが示された(Defenouillère et al., 2013; Matsuda et al., 2014; Verma et al., 2013)(図 1-9)。RQC 機構では、ノンストップ mRNA 由来の異常新生ペプチド鎖のみならず、リボソームの翻訳伸長停滞によって生じた短鎖型新生ペプチド鎖も分解の対象となる。

RQC に必須な E3 ユビキチンリガーゼである Ltn1、もしくは Rqc1 非存在下では異常新生鎖が分解されず、60S サブユニット上にペプチジル tRNA の状態で保持される。この場合に、Rqc2 依存的に、鋳型 mRNA 無しに異常新生鎖の C 末端にアラニンもしくはスレオニンの混合鎖(CAT-tail: C-terminal Alanine Threonine-tail)が付加される(Shen et al., 2015)。CAT-tail が付加された異常新生鎖は疎水性の CAT-tail を持つため凝集しやすく、シャペロンタンパク質 Sis1 と共に細胞質に凝集体を形成する(Choe et al., 2016; Defenouillere et al., 2016; Yonashiro et al., 2016)。Listerin 欠損マウスは神経変性様症状を

示すことから、*Listerin* 欠損神経細胞において凝集体が蓄積し、疾患が発症する可能性が現在議論・検証されている。

一連の RQC 機構は、全て 60S リボソーム上で行われるため、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームや翻訳伸長停滞した 80S リボソームは、ペプチジル tRNA を保持した状態の 60S サブユニットと 40S サブユニットに解離すると考えられる。これまでのモデルではリボソームのサブユニット解離は Dom34/Pelota-Hbs1 および Rli1/ABCE1 が行なうと考えられていたが、tRNA 擬態タンパク質である Dom34/Pelota はリボソームの A サイトに結合する際、N 末ドメインが A サイト深くに結合し mRNA が本来存在する位置を占有することが、構造解析から明らかにされている(Hilal et al., 2016; Shao et al., 2016)。つまり、ノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームの場合は A サイトが空になるため、Dom34/Pelota は結合し得るが、ORF 途中での翻訳伸長停滞の場合、A サイトには mRNA が存在するため、Dom34/Pelota が結合できるか否かは不明である。少なくとも *in vitro* においては、A サイトに mRNA が存在する停滞リボソームを基質とした場合、Dom34/Pelota は A サイトに結合することがわかっているが、その際に mRNA 由来の density が構造中から消失しており、mRNA がどのようにして取り除かれるかも明らかにされていない。

また当研究室による解析により、翻訳伸長停滞に由来する異常タンパク質分解機構のうち Ltn1 依存的な RQC と異なる経路として、Ccr4-Not 複合体の構成因子のひとつである E3 ユビキチンライゲース Not4 が新生ペプチド鎖の分解に重要な因子であることを明らかにしている(Dimitrova et al., 2009; Matsuda et al., 2014)。

1-3. 翻訳アレスト(翻訳伸長停滞)

1-3-2. 翻訳アレストの発見

リボソームの翻訳停滞(アレスト)は *E. coli* 大腸菌を含む原核生物において非常によく研究されてきた。代表的な研究としてここでは *SecM-SecA* mRNA を紹介する(Oliver et al.,

1998)。大腸菌の SecM は、*secA*(Sec トランスロコンを介した新生タンパク質の膜透過を駆動する ATPase)のリーダー領域にコードされている 170 残基からなるポリペプチド鎖で、新生ポリペプチド鎖のアミノ酸配列に依存してリボソームの停滞が起こる。C 末端付近の 17 アミノ酸(F¹⁵⁰XXXXWIXXXXGIRAGP¹⁶⁶)が SecM のアレスト配列であり、166 番目の Pro コドンが P サイトで Pro-tRNA と相互作用した状態でアレストする(Nakatogawa and Ito, 2001; 2002)。

SecM には N 末端に膜輸送に関与するシグナル配列、C 末端付近に翻訳伸長アレストとリボソームの停滞を引き起こすのに必須な配列(アレスト配列)が存在する。*SecM* mRNA を翻訳するリボソームは、アレスト配列の翻訳直後に停滞(アレスト)する。正常な膜透過過程では、SecM の翻訳途上鎖が、SecA を介した膜透過反応により引っ張られること(物理的な作用)でアレストが解除され、分泌される。この際、下流の *secA* mRNA の翻訳は、SD 配列が二次構造によってマスクされているため抑制される(Nakatogawa and Ito, 2001; Tenson and Biology, 2002)。一方、SecA が欠乏した状況下では、翻訳途上の SecM タンパク質がアレストから解除されず、停滞が継続する。その結果、マスクされていた下流の *secA* mRNA の SD 配列が解放され、翻訳が開始される。このように SecM は、SecA の基底レベルの発現を支えると同時に、自身のアレストで細胞内の分泌活性をモニターしている。

1-3-2. 連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳アレスト

当研究室では出芽酵母において連続した塩基性アミノ酸配列がリボソームの翻訳アレストを引き起こし、この翻訳アレストによって RQC および NGD が起こることを明らかにした(Kuroha et al., 2010)。リボソームが連続した塩基性アミノ酸配列であるポリリジン(K12)、ポリアルギニン(R12)配列を翻訳することで生じる翻訳アレストは、塩基性アミノ酸残基が保持する正の電荷と、新生ペプチド鎖が通るリボソームトンネル内壁

を構成する rRNA の負の電荷が相互作用することで起こると考えている(Lu et al., 2007)。この翻訳アレストはリボソーム結合タンパク質 Asc1/RACK1 存在下で効率的に生じることを明らかにした。また、リボソームとの結合が低下する Asc1 R38D K40E 変異体および D109Y 変異体を用いた解析により、RACK1 がリボソームと結合していることが翻訳アレストに重要であることを示唆した(Kuroha et al., 2010)。

1-3-3. 連続したレアコドン配列による翻訳アレスト

翻訳アレストは連続したレアコドン配列においても引き起こされることが出芽酵母による研究で明らかになった。レアコドンとは、ゲノムにコードされる全ての遺伝子において、使用されるコドンの割合、すなわち出現頻度が極端に低いコドンである。例えば出芽酵母においてアルギニンをコードする CGA コドンの全コドンに対する出現頻度は 0.3%程度、最も翻訳効率(TE)の高い CGC コドンの TE を 1 とした時の、CGA コドンの TE は全コドン中最低の 0.00013 である(Pechmann and Frydman, 2013)。

翻訳アレストを引き起こすレアコドンは出現する頻度が低いだけでなく、コドンに対応する tRNA の分子数が極端に少ない。出芽酵母 CGA コドンに対応する tRNA は完全一致の tRNA^{Arg} (UCG)が存在しないため、tRNA^{Arg} (ACG)から産生される tRNA^{Arg} (ICG)である。tRNA アンチコドンループのイノシン(I)は wobble 位となり CGA コドンのアラニン(A)との相互作用が弱い。そのため CGA コドン連続して出現するとペプチド鎖伸長反応が停滞し、翻訳アレストを引き起こす。連続した CGA レアコドンでの翻訳アレストによる、全長タンパク質の発現抑制には、CGA コドン 2 個で十分影響がある。また昨年、連続した CGA 配列による翻訳アレストに重要な因子としてリボソームタンパク質 Rpl1b が同定された(Letzring et al., 2013)。本論文でも後述するが、連続したレアコドン配列による翻訳アレストは Asc1 および Hel2 にも依存する(Brandman et al., 2012; Saito et al., 2015)。

1-3-4. 小胞体ストレス応答と細胞質スプライシング

高等真核生物においても翻訳アレスト制御機構が発見され、研究されている。XBP1u mRNA は翻訳アレストによって自身の局在を制御し、細胞質中において自身のスプライシングを誘導する(Yanagitani et al., 2009, 2011)。

小胞体はタンパク質のフォールディングを行なう細胞内小器官である。UPR (unfolded protein response) は、熱ストレス等によってミスフォールディングを引き起こしたタンパク質が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスが生じると、シャペロンや異常タンパク質の分解因子の発現を誘導し、ストレスを緩和する機構であり、UPR で発現誘導される転写因子の一つが XBP1 である。

前駆体 mRNA の XBP1u が翻訳されると、C 末端領域に保存されているアレスト配列によって翻訳停滞が生じる。合成された新生ペプチド鎖が保持する疎水性領域を介して、リボソームは翻訳停滞した状態で小胞体膜に局在する。小胞体膜上に存在する IRE1 α は小胞体ストレスによって自己(相互)リン酸化-ホモ二量体化し、活性型となった IRE1 α の細胞質側ドメインの RNase 活性によって XBP1u がスプライシングを受けることで、成熟型の XBP1s mRNA となる。

1-3-5. 翻訳伸長阻害を引き起こすシス配列

本論文では、前述のポリリジン、ポリアルギニン、CGA レアコドンに加えて、mRNA 高次構造による翻訳伸長阻害として、安定なステムループ構造、およびグアニン四重鎖構造 G-quadruplex を形成する(GGN)₁₂ を扱う。また、配列のみならず環境やストレス依存の翻訳アレストについても言及する。

1-4. ユビキチン化の機能

1-4-1. ユビキチンとユビキチン化酵素

本論文第 2 章および第 3 章にて解析の中心となる因子、Hel2 および Ubc4 はユビキチ

ン化に関与する酵素であるため、ここでユビキチンおよびユビキチン化について説明する。ユビキチンは 76 アミノ酸から構成されるゲノムコードのタンパク質で、真核生物において非常に高度に保存されている(図 1-10)。出芽酵母においては、5 つのユビキチンが繋がった状態でコードされている *UBI4* 遺伝子と、ユビキチンの C 末にリボソームタンパク質が繋がった状態でコードされている 3 遺伝子 *RPL40A*, *RPL40B*, *RPS31* として存在しており、DNA から転写-翻訳された後にユビキチン特異的プロテアーゼ(脱ユビキチン化酵素: DUB)によって切断されることで産生される。またタンパク質は、メチル化やアセチル化、リン酸化、脂質付加、糖鎖付加等、様々な翻訳後修飾を受けることが知られているが、ユビキチン化も生物における主要なタンパク質翻訳後修飾の一つである。ただし、メチル化やアセチル化、リン酸化が官能基(小分子)付加修飾であるのに対して、ユビキチン化は 76 アミノ酸のタンパク質を標的タンパク質の(主に)リジン残基に付加修飾される。ユビキチン化は、ヒストンを代表する様々なタンパク質の機能調節や、細胞内で不要となったタンパク質の分解シグナルとして機能する。

ユビキチン化はユビキチン化酵素によって行われるカスケード反応であり、真核生物に広く保存されている。ユビキチンは ATP 依存的にユビキチン活性化酵素(E1)のシステイン残基に結合することで化学的に活性化された後、ユビキチン結合酵素(E2)のシステイン残基に受け渡される。E2 は ユビキチン転移酵素(E3; ユビキチンリガーゼ)上の E2 結合ドメインに結合し、さらに E3 は E2 結合ドメインとは異なる領域で標的タンパク質(基質)に結合し E3 上で E2 から基質のリジン残基にユビキチンが付加される(図 1-10)。更にユビキチン鎖伸長酵素(E4, E3 を兼ねる場合が多い)が E3 同様に基質と E2 に結合し、基質に付加されたユビキチンにさらにユビキチンを付加するユビキチン鎖伸長反応(ポリユビキチン化)を行なう。本研究で用いる出芽酵母には E1 が 1 種、E2 が 11 種、E3 が約 100 種、DUB が 20 種存在し、様々な基質・細胞内局在等によって使い分けている。E1 は酵母からヒトまで高度に保存されており、ヒトでも 1 種類のみである。E2 は E3 のタ種類に応じて使い分けられている。例えば Ubc4/Ubc5 は RING-finger 型 E3

を介したユビキチン化における主要な E2 であり、Ubc13-Mms2 E2 複合体は K63 鎖形成に寄与する。最も種類が多い E3 はユビキチン化の基質特異性を決定する重要な分子で、その機能、標的は多岐にわたっており、ユビキチン化の多様性を担っている。代表的な E3 として、RING-finger 型、HECT 型、U-box 型がある。この内 RING-finger 型は RING(really interesting new gene)-finger ドメインを介して E2 と結合し、E2 から基質に直接ユビキチンを付加する。また、RING-finger ドメインサブユニットと足場サブユニット、基質認識サブユニットがそれぞれ異なるタンパク質で構成される Cullin 型 E3 や、RING-finger ドメインを 2 つと IBR(in between RING)ドメインを持つような RBR 型 E3 も、広義には RING-finger 型 E3 である。HECT 型 E3 は、E2 から直接基質にユビキチンを付加せずに、HECT ドメイン内のシステイン残基に一度転移させた後に、基質へと付加する様式を取る。また、U-box 型 E3 は RING-finger ドメインと類似の構造をとる U-box ドメインを持つが、亜鉛イオンを配位しないためドメインの推定が難しい。脱ユビキチン化酵素はユビキチンを基質からはずす酵素である。活性中心にシステインを持つシステインプロテアーゼと、活性中心に金属イオンをもつメタロプロテアーゼに大別される。細胞内のタンパク質分解装置であるプロテアソームにはサブユニットとして Rpn11 メタロプロテアーゼが結合しており、分解直前のタンパク質の脱ユビキチン化を担っている。また、Ubp6 もプロテアソームに結合することが知られている(Sakata et al., 2011)。

1-4-2. ユビキチン化の多様性と機能

ユビキチン化は基質のリジン残基に 1 つのユビキチンが結合したモノユビキチン化と、ユビキチン自身のリジン残基または N 末端のメチオニン残基にユビキチンを次々と付加することで伸長した、ポリユビキチン化がある(図 1-10)。モノユビキチン化はヒストン修飾を始め、タンパク質や細胞内現象の調節の役割を担う。一方、ポリユビキチン鎖にはユビキチンのリジン残基別に、K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖、K48 鎖、K63 鎖および直鎖状の M1 鎖が存在する(図 1-10)。細胞内のポリユビキチン鎖のう

ち主要なものは K48 鎖、K63 鎖であり、次いで K29 鎖、K11 鎖の割合が高い。ユビキチン K48-ポリユビキチン鎖はタンパク質分解酵素複合体プロテアソームによる分解のシグナルとなる。また K63 鎖は遺伝子発現制御や DNA 修復やエンドサイトーシス等のタンパク質分解以外のシグナルカスケードに関わることがわかっている。すべてのユビキチン鎖の機能はわかっておらず、K6 鎖、K27 鎖、K33 鎖などの非典型的なポリユビキチン鎖は解析例が少ない。また、ユビキチン鎖には混合鎖の存在も知られており、例えば、K48-K63-混合鎖が炎症応答機構における NF κ B シグナルを制御することが明らかになった(Ohtake et al., 2016)。さらに、ユビキチンの 65 番目のセリン残基(Ser65)がパーキンソン病原因遺伝子の一つである PINK1 によってリン酸化されることで、同じくパーキンソン病の原因遺伝子である Parkin を活性化し、不良ミトコンドリアの分解を促すことも報告された(Koyano et al., 2014)。

このように、ユビキチン化シグナルは多岐にわたっており、ユビキチン自身の翻訳後修飾(アセチル化、リン酸化等)も含めると、更に種類が膨れ上がる。その複雑な制御機構の解析には相応の解析技術の進歩が不可欠である。

1-4-3. ユビキチン-プロテアソーム系

細胞内の異常タンパク質分解機構は K48 鎖による制御を受けている事が多い。ユビキチン-プロテアソーム系(UPS: Ubiquitin-proteasome system)では E3 によって基質が K48-ポリユビキチン鎖修飾され、26S プロテアソームの 19S サブユニットタンパク質 Rpn10 および Rpn13 によってユビキチン鎖が認識される(Sakata et al., 2012)。19S サブユニット蓋部の脱ユビキチン化酵素 Rpn11 による脱ユビキチン化が行われた後、20S サブユニットのプロテアーゼ活性を介した基質タンパク質の分解が行われる(図 1-11)。Rpn11 によって外されたユビキチンはユビキチンプロテアーゼによって再び切断された後に再利用される。また、本研究において解析の対象とした Ltn1 は、60S リボソーム上で RQC 複合体を形成し、新生ペプチド鎖を基質としてポリユビキチン化し、最終

的にプロテアソーム依存的な分解を促す(Verma et al., 2013)(図 1-9)。武田薬品工業の米子会社ミレニウムが開発した抗がん剤であるボルテゾミブ(Velcade® , PS-341)は、プロテアソーム阻害剤であり、多発性骨髄腫等に使用されている。なお本研究ではプロテアソーム内部に結合し、活性を阻害するトリペプチドのプロテアソーム阻害剤 MG132 を研究に使用した。

1-4-4. リボソームのユビキチン化

本研究第 2 章および第 3 章では RING-finger 型 E3 である Hel2 が、リボソーム 40S サブユニットの構成タンパク質をユビキチン化することを明らかにしている。リボソーム自体のユビキチン化は以前から知られており、ユビキチン化されたタンパク由来のトリプシン消化ペプチドを特異的に認識する抗 Gly-Gly 抗体で精製したサンプルの SILAC-MS 解析等によって網羅的にユビキチン化サイトの解析がなされている(Swaney et al., 2013)。しかし、ユビキチン化サイトがわかっているにもかかわらず、その機能やユビキチン化を担う E3 酵素はほとんど明らかにされておらず、あまり解析されていない研究領域であった。

京都大学の北畠博士らのグループは、変異を持つ異常 25S rRNA の分解時に、GUARD 複合体によるリボソームのユビキチン化が必要であることを明らかにした(Fujii et al., 2009, 2012)(図 1-7)。リボソームは rRNA と構成タンパク質が密接に絡まっていることから、rRNA を分解するためには周りのタンパク質を剥がして分解する必要があるためと考えられる。また、Kraft らの研究では、リボソーム 60S サブユニットタンパク質の Rpl25 のユビキチン化が、脱ユビキチン化酵素複合体 Ubp3-Bre5 により解消されることが、栄養飢餓時のリボソーム選択的オートファジー(リボファジー; Ribophagy)に必要であることを明らかにしている(Cebollero et al., 2012; Kraft et al., 2008)。なお、本研究では Hel2 によるリボソーム 40S サブユニットタンパク質 Rps20 のユビキチン化が RQC の誘導、おそらく停滞したリボソームの認識に必須であることを明らかにしている。

第 2 章

翻訳伸長停滞に起因する新生ポリペプチド品質管理機構

Ribosome-associated quality control における

E3 ユビキチン化酵素 Hel2 の機能解析

第 2 章 翻訳伸長阻害に起因する新生ポリペプチド鎖品質管理機構 Ribosome-associated quality control における E3 ユビキチン化酵素 Hel2 の機能解析

2-1. 序論

2-1-1. 翻訳伸長反応

遺伝子発現過程において mRNA がコードする遺伝情報をタンパク質へと変換する過程が"翻訳"である。翻訳は大きく分けて 3 つのステップによって行われている(図 1-12)。

1)翻訳開始反応では 40S リボソームと翻訳開始因子、開始 tRNA からなる 43S 翻訳開始前複合体が、mRNA 上の翻訳開始因子 eIF4E-4G と相互作用することで、48S 翻訳開始前複合体が形成され、mRNA 上の開始コドンを探査する。開始コドンを確認すると、開始コドン上で 60S サブユニットと会合し 80S リボソームを形成することで、タンパク質をコードする領域の翻訳を開始する。2)翻訳伸長反応では、mRNA 上の読み枠、すなわちコドンに対応するアミノアシル tRNA-eEF1A がリボソーム A サイトで mRNA 上のコドンとコドンアンチコドン対合し、その後リボソーム P サイトに存在するペプチジル tRNA からアミノアシル tRNA にペプチド鎖を移すペプチド鎖転移反応が起こる。eEF2 によってペプチド鎖を受け取った tRNA がリボソーム P サイトへと移動し、P サイトにいた tRNA は E サイトへと移動しリボソームから除去される。この一連の反応を繰り返すことで、タンパク質合成を進行する。3)翻訳終結反応では、mRNA 上の終止コドンを翻訳終結因子 eRF1-eRF3 がリボソーム A サイトにて認識し、P サイトに存在するペプチジル tRNA から合成したペプチド鎖をリリースする。その後リボソームサブユニット解離因子 Rli1/ABCE1 がリボソームを 40S と 60S に解離することでリボソームはリサイクルされ、翻訳の一連の反応が終結する。このように翻訳の過程では複雑かつ精密な分子反応を繰り返している。

翻訳開始反応は、翻訳開始前複合体による開始コドンスキニングを経て、開始コド

ン上で反応が行われる。翻訳終結反応も翻訳終結因子による終止コドンの認識によって反応が開始される。特定の一つのコドン上で行われるという観点から、翻訳伸長反応と比較して静的な反応として捉えることができる。その詳細な機構は現在までに非常に良く研究されており、一連の分子反応の詳細な機構が明らかになりつつある。一方で翻訳伸長反応は一つのコドン上での反応を終止コドンまで繰り返すことで、反応の場所が次々と変化していく、動的な反応として捉える必要がある。近年、このような観点から翻訳伸長反応を捉える解析が進み、同じアミノ酸をコードする同義コドン間においても翻訳効率の顕著な差異があることや、翻訳伸長反応は一定のスピードではなく、緩急を伴うことが示された(Pechmann and Frydman, 2013)。このような codon optimality の概念では、翻訳効率が高いコドン(optimal コドン)と低いコドン(non-optimal コドン)とに大別し、翻訳効率を数値化して評価することができる。実際に、同義コドン置換変異(サイレント変異)はタンパク質のアミノ酸配列は変化しないにも関わらず、疾患の原因となる症例が報告されている(Hunt et al., 2014; Sauna and Kimchi-Sarfaty, 2011; Tsai et al., 2008)。さらに、コドン選択と mRNA 安定性およびタンパク質フォールディングに相関があることも明らかになり、翻訳の、特に伸長段階における様々な制御機構の重要性が示唆されている(Gamble et al., 2016; Mishima and Tomari, 2016; Pechmann et al., 2014; Presnyak et al., 2015)。

当研究室では、翻訳伸長段階の制御機構として、ポリ A 配列やレアコドンクラスターなどの配列の翻訳により、翻訳伸長反応の停滞が生じること、またこれが異常翻訳と識別され、mRNA および途中まで合成された新生ポリペプチド鎖の品質管理機構が誘導されることを明らかにした(Dimitrova et al., 2009; Kuroha et al., 2010)。現在までに翻訳伸長停滞に起因する品質管理機構の詳細な分子メカニズムは解析途上段階にあり、その全容は明らかにされていない。本研究では、翻訳伸長停滞に起因する新生ポリペプチド鎖の品質管理機構である Ribosome-associated quality control (RQC)の分子機構を明らかにすることを目的として解析を進めた。

2-1-3. Ribosome-associated quality control (RQC)

ノンストップ mRNA のポリ A 鎖もしくは 3'末端で停滞したリボソームや、翻訳伸長反応の途中で停滞したリボソームは、異常なノンストップタンパク質や合成途中の短鎖型タンパク質を保持している。RQC ではこのような異常タンパク質を、停滞したリボソームを指標として識別し分解する(Brandman and Hegde, 2016; Brandman et al., 2012)(図 1-9)。RQC 機構ではまず停滞したリボソームのサブユニット解離が起こり、異常タンパク質をペプチジル tRNA の状態で保持した 60S サブユニットが生成される(Brandman et al., 2012)。この 60S サブユニット上に RQC 因子である Rqc1/TCF25、Rqc2/NEMF、および E3 ユビキチン化酵素 Ltn1/Listerin が会合することで RQC 複合体を形成する。Ltn1 は RQC 複合体上でペプチド鎖を基質としてユビキチン化する(Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman and Hegde, 2016)。ユビキチン化されたペプチド鎖は AAA-ATPase である Cda48-Npl4-Ufd1 複合体によって RQC 複合体から引き抜かれ、最終的に 33 個のタンパク質によって構成される細胞質中のタンパク質分解装置プロテアソームによって分解される(Defenouillère et al., 2013; Verma et al., 2013)。また、近年の研究により、RQC 複合体中に Ltn1 や Rqc1 が存在しない場合に Rqc2 が鋳型非依存的にペプチド鎖にアラニンもしくはスレオニンを付加する現象が報告され、この時形成されるアラニン-スレオニン鎖は C-terminal Ala-Thr rail: CAT-tail と命名された(Shen et al., 2015)。CAT-tail の形成は新生鎖の疎水性を高め、タンパクの凝集を促す。シャペロンタンパク質 Sis1 は CAT-tail が付加されたペプチド鎖に結合するが、最終的に凝集体に取り込まれる(Choe et al., 2016; Defenouillere et al., 2016; Yonashiro et al., 2016)。マウスにおける Ltn1 のオルソログ Listerin の欠損マウスは神経変性様症状を呈するため、Ltn1 非存在下のタンパク凝集との関連が疑われている(Chu et al., 2009)。このように RQC 機構は分子機構から生理学的重要性まで非常に良く解析されてきた。

本品質管理機構の対象となるリボソームには、ノンストップ mRNA のポリ A 鎖もしくは 3'末端で停滞したリボソームや、翻訳伸長反応の途中で停滞したリボソームがある。

前者は翻訳終結因子と相同性を持つ Dom34/Pelota-Hbs1 が空の A サイトを認識して結合することで、Rli1/ABCE1 によるリボソームのサブユニット解離を促進し、RQC 複合体形成を誘導する。しかし、後者は Dom34/Pelota-Hbs1 非依存に RQC が誘導されるため、停滞したリボソームの認識およびリボソームの解離誘導機構は不明のままであった (Chen et al., 2010; Tsuboi et al., 2012)。本研究では翻訳伸長段階で停滞したリボソームの認識機構を明らかにするため、出芽酵母を用いたスクリーニングによって得られた候補因子である E3 ユビキチン化酵素 Hel2 に着目した機能解析を行なった。

2-1-3. 翻訳伸長停滞

RQC は翻訳伸長停滞したリボソームをトリガーとして誘導されるが、どのような翻訳伸長停滞によって誘導されるかに関して、その特徴の全容は不明であった。現在までに明らかにされている RQC 誘導性の停滞配列として、当研究室で以前発見したポリ A 配列が存在する (Ito-Harashima et al., 2007)。ポリ A 配列はポリリジンをコードするため、リボソームトンネル内を通る際に負に帯電した rRNA と静電相互作用し停滞すると考えている。しかし、リジンをコードする 2 種類のコドンのうち、AAA コドンの連続配列では効率的な翻訳伸長停滞と RQC を誘導できるが、AAG コドンの連続配列では RQC の誘導が弱いことが観察されており、ポリリジンをコードする配列に起因する翻訳伸長停滞には、新生鎖の配列以外にコドンの種類も重要であることが示唆されている (Arthur et al., 2015)。また、同様に塩基性アミノ酸をコードするアルギニンの連続配列は翻訳伸長停滞を引き起こす (Dimitrova et al., 2009)。アルギニンコドンは 6 種類存在するが、このうち CGA コドンは出芽酵母においてレアコドンであり、CGA コドンに完全対応する tRNA(UCG) がゲノム上にコードされていない。そのため、tRNA(UCG) の代わりに、tRNA(ACG) のアデニンの塩基修飾によってイノシンの変換した tRNA(ICG) を用いて読むが、このとき CGA コドンのアデニンをイノシンで読む、すなわち A-I wobble (揺らぎ) 塩基対を形成する必要があるため、翻訳効率が非常に低くなっている (Gamble et al.,

2016; Letzring et al., 2013; Wolf and Grayhack, 2015)。これらの理由により CGA コドンの連続配列は翻訳伸長停滞を引き起こし RQC を誘導する。一方で、アルギニンコドンのうち optimal コドンである AGA コドンの場合、12 回連続配列 R(AGA)₁₂ を持つ場合、全長タンパク質の翻訳効率は低下するものの、RQC は誘導されない(図 2-15)。以上を示すように、タンパク質を合成する上でのコドン選択は非常に重要であることがわかる。翻訳伸長停滞は mRNA の構造形成によっても引き起こされる。例えば安定なステムループ構造やシュードノット構造、グアニン四重鎖構造(G-quadruplex)はリボソームを停滞させる(Chen et al., 2010; Doma and Parker, 2006; Tsuboi et al., 2012)。また、RNA-RNA 間のトランスな二重鎖形成によってもリボソームの停滞が生じる(Sinturel et al., 2015)。これらの構造形成は、mRNA 品質管理機構 No-go decay (NGD)やフレームシフトの引き金となる。しかしこれらの mRNA 構造による翻訳停滞は比較的弱く、一般に RQC を誘導しないことが知られている。

また、mRNA や新生ペプチド鎖の配列以外に起因する翻訳伸長停滞も存在する。例えば、シクロヘキシミド(cycloheximide)のような翻訳伸長阻害剤の処理や、アミノアシル tRNA またはアミノ酸欠乏状態においては翻訳伸長反応が停滞する。酸化ストレス条件下においては mRNA の塩基が酸化修飾を受け、tRNA がコドン-アンチコドン対合を形成できずリボソームが停滞する(Simms et al., 2014)。さらに、nonfunctional rRNA decay (NRD)の分解基質となるような変異 rRNA を持つリボソームによっても、翻訳伸長停滞が生じると考えられる(Cole et al., 2009)。しかしこれらの条件において、RQC が誘導されるか否かに関しては解析技術が進んでおらず不明のままである。また、ゲノムにコードされている内在性の配列においても翻訳停滞配列は存在するが、これらの配列によって品質管理機構が誘導されるか否かに関しては解明されていない。

2-1-4. *nad2* 変異株による *HEL2/YDR266C* の同定

出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニングによって、翻訳伸長停滞に関与する因子と

して同定した(Brandman et al., 2012; Kuroha et al., 2010)(図 2-2)。本スクリーニングでは、転写活性が平均より極めて弱い *CYC1* プロモーター下に、CGA レアコドンクラスターを含む連続した 12 個のアルギニンをコードする配列を *GFP* と *FLAG-HIS3* の間に挿入したレポーター (*GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3*)を導入した出芽酵母を用いた。通常野生株(ここではヒスチジン合成遺伝子 *his3* 欠損株)では、R(CGN)12 配列において翻訳停滞し RQC が誘導されるため、下流の *HIS3* 遺伝子を翻訳できず、ヒスチジン欠損培地では生育できない。しかし、R(CGN)12 配列での翻訳伸長停滞もしくは RQC を回避するような変異をもった酵母株では下流の *HIS3* 遺伝子を翻訳するため、ヒスチジン欠損培地で生育可能となる。このようなレポーター遺伝子を導入した出芽酵母を 24 時間培養後、ヒスチジン欠損培地に塗布し、生育した突然変異株を単離した。責任遺伝子 *NAD* (*nascent peptide-dependent translation arrest defective*)をタイリングアレイにより決定した。その結果 *NAD1* としてリボソーム 40S サブユニットタンパク質をコードする *ASC1* を同定した。当研究室のこれまでの解析から、Asc1 は R(CGN)12 配列による効率的な翻訳伸長停滞に必須であり、RQC および NGD にも重要であることが明らかにした(Brandman et al., 2012; Kuroha et al., 2010)(副論文)。また本研究において *nad2* 変異株の変異ローカスを調べたところ、E3 ユビキチンリガーゼをコードする *HEL2* に変異を有していた。*nad2* 変異株から精製したゲノム DNA のシーケンス解析を行ない、*HEL2/YDR266C* 遺伝子にナンセンス変異が存在することを明らかにした。*HEL2/YDR266C* 遺伝子の 532 番目の塩基がグアニンからウラシルに変異し、178 番目のアスパラギン酸コドンがオーカー(終止コドン)に変異していた(図 2-2)。また、p416*CYC1p-GFP-R12-FLAG-HIS3* レポーターと p*HEL2p-HEL2* プラスミドを用いて、野生株(*NAD2*)、*nad2-1* 変異株、*hel2Δ*株を形質転換し、ヒスチジン欠損培地を用いてスポットアッセイを行なうことで、*nad2-1* 変異株が *HEL2* のみに変異を持つことを明らかにした。すなわち *NAD2* を *HEL2/YDR266C* として決定した(図 2-2)

Hel2 は細胞質中において過剰に生産されたヒストン H3、H4 タンパク質の分解に関

与する因子として最初に機能同定された(Singh et al., 2012)。RING-finger 型 E3 ユビキチンリガーゼであり、RING-finger ドメインを介して E2 である Ubc4 または Ubc5 と結合し、基質をユビキチン化する。また、網羅的な解析により、細胞質局在であること、リボソームに結合することが示されている(Fleischer et al., 2006; Ho et al., 2002)。Weissman らと当研究室の解析によって、Asc1 同様に R(CGN)₁₂ 配列による効率的な翻訳伸長停滞および、翻訳伸長停滞に起因する RQC に必須な因子であることが明らかにされた(Brandman et al., 2012)。また Frydman らの解析により、正常な mRNA 由来のミスフォールドタンパク質の分解にも関与することが示唆された(Duttler et al., 2013)。しかし Hel2 の直接的な機能に関しての解析は十分ではなく、Hel2 のユビキチン化基質や Asc1 との関係などは不明であった。本研究では Hel2 のユビキチン化基質の探索同定を行うことで、翻訳伸長停滞に起因する RQC における Hel2 の機能を明らかにすることを通じて、RQC 機構の包括的理解を目指した。

2-1-5. 品質管理機構における *HEL2* の機能

nad 変異株スクリーニングおよび Dr. Weissman 研究室との共同研究により、Hel2 は連続した塩基性アミノ酸依存的な翻訳アレストに必須な因子であることを報告した(Brandman et al., 2012)。Hel2 は Asc1/RACK1 とともに翻訳アレストしたリボソームを認識する分子もしくは積極的にリボソームを停止させる因子として考えられる。

近年、Hel2 が正常 mRNA の翻訳における新生ペプチド鎖をユビキチン化する因子として報告された(Duttler et al., 2013)。RQC を介した新生ペプチド鎖分解機構に関与する E3 ライゲース *LTN1* の単独欠損株および *HEL2* の単独欠損株ではユビキチン化された新生ペプチド鎖の割合はわずかに減少する程度であるが、*ltl1Δhel2Δ* 二重欠損株ではユビキチン化された新生ペプチド鎖の割合が劇的に減少することが明らかにされた。また、*ltl1Δhel2Δ* 株ではタンパク質のフォールディング異常を誘発するプロリンアナログ AZC を含む培地において顕著な生育阻害が観察された。さらに正常 mRNA から翻訳される

細胞内の新生ペプチド鎖のうち 1-5%程度はユビキチン化を受けていることが明らかにされ、これらのユビキチン化が Hel2 によって行われるモデルが提唱された。

異常翻訳に由来する品質管理に関与する例として、終止コドン手前に連続した塩基性アミノ酸配列をコードするポリ A 鎖(K12)を挿入したレポーター由来産物の分解に Hel2 が関与することが示唆されている(Duttler et al., 2013)。しかし、ノンストップ mRNA 由来産物の分解には関与しない(Saito et al., 2015)。また、レアコドンクラスターによる翻訳アレストに起因する RQC に Hel2 が必須であること、Hel2 が K63-ポリユビキチン鎖形成を行なうことで品質管理機構に貢献することが、遺伝学的に示唆されている(Saito et al., 2015)。

2-1-6. リボソームプロファイリング

Dr. Nicholas Ingolia らによって、リボソームがある時点で翻訳している領域をゲノムワイドに解析する手法、すなわち個々の遺伝子における翻訳効率を評価することができる手法であるリボソームプロファイリング法が開発された(Ingolia et al., 2009)。翻訳伸長阻害剤等を用いてリボソームを mRNA 上に固定し、RNase 処理によりリボソームがマスクしていた領域以外の mRNA を分解することで残る 28-30 塩基程度の長さの RNA 断片を、次世代シーケンサーを用いて解析し配列をゲノム上にマップすることで、ある配列上に存在していたリボソームの footprint として評価する解析系である。また、同時にトータル RNA サンプルの RNA-seq を行い、細胞内 mRNA 量と footprint の比を評価することで、個々の mRNA の翻訳効率を評価することが可能になった。この手法を応用することで、様々な細胞や組織、遺伝子欠損条件、ストレス条件における全体の翻訳効率を評価できるだけでなく、小胞体やミトコンドリアに移行するタンパク質をコードする遺伝子のみに焦点をあてて、翻訳効率をはかることも可能となった。当研究室では、Ingolia Lab.との共同研究において、翻訳伸長阻害剤であるサイクロヘキシミドを処理しない条件でライブラリ作製を行なうことで、異なる 2 種類の長さの footprint 情報を

元にリボソームの停滞状況を評価した。また本研究では footprint の情報を元に、新規翻訳停滞配列を推定し、解析を行った。

2-2. 目的

本項では、レアコドンクラスター配列を中心とした翻訳伸長停滞によって誘導される RQC 機構における、Hel2 の機能解析、具体的には Hel2 のユビキチン化基質の同定を軸とした解析により、RQC 機構の解明を目的として研究を行った。以下に示す 3 点に焦点を当てて、解析を行なった。

1. Hel2 による停滞リボソームの認識機構
2. Hel2 の基質特異性
3. ユビキチン化リボソームの役割

2-3. 結果

2-3-1. Hel2 は R(CGN)12 配列による翻訳伸長停滞に起因して起こる RQC に必須な因子である

nad 変異株スクリーニングにおいて単離した *nad2-1* 変異株ゲノム DNA のシーケンス解析によって、*nad2-1* 変異株は *HEL2* 遺伝子の 532 番目のグアニンがチミン(ウラシル)に変異しており、これがナンセンス変異となることを明らかにした(図 2-2)。またヒスチジン欠損培地を用いたスポットアッセイにおける相補実験によって *nad2-1* 変異株は *HEL2* 遺伝子のみに変異を持つことを遺伝学的に明らかにした(図 2-2)。

Nad1 として当研究室で以前同定した Asc1/RACK1 は翻訳伸長停滞に必須であることから、Nad2/Hel2 に関しても同様の結果が得られると想定し、まず翻訳伸長停滞における Hel2 の機能について、出芽酵母を用いた遺伝学的解析を行なった。p416GPDp-GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3 レポーター(図 2-3A)を用いて、出芽酵母野生株(WT)および遺伝子欠損株を形質転換し、ウエスタンブロット解析により全長タンパク質 GFP-R(CGN)12-FLAG-His3 (FL)を検出し、翻訳停滞効率を評価した。その結果、*hel2Δ* 株では野生株(WT)と比較して全長タンパク質量が増加、すなわち R(CGN)12 配列における翻訳停滞効率が低下していた(図 2-3B)。また Hel2 は細胞質中において過剰に生産

されたヒストン H3/H4 タンパク質の分解に関与することが報告されていたため、同様の機能をもつことが報告されている E3 ユビキチンリガーゼ *HEL1* の欠損株に関しても確認したところ、翻訳停滞への関与は観察されなかった(図 2-3B)。以上の結果から Hel2 はヒストンとは異なるユビキチン化基質を持つと考えられる。また、Hel2 の RING ドメインを介して相互作用する E2 ユビキチン結合酵素 Ubc4 と Ubc5 の遺伝子欠損株について同様に解析したところ、*ubc4Δ*株では翻訳アレスト効率の減少が見られたが、*ubc5Δ*株では見られなかった(図 2-3B)。これは出芽酵母細胞内のそれぞれの分子数(発現量)が異なるためと考えられる。Saccharomyces Genome Database によるとそれぞれの 1 細胞あたりの存在量は Ubc4 が 13,500 分子、Ubc5 が 981 分子であることから、*ubc5Δ*株では依然として Ubc4 が一定量存在するために、翻訳停滞効率の低下が見られなかったと考えられる。

次に、野生株(WT)、*hel2Δ*株、*ubc4Δ*株において R(CGN)12 配列による翻訳伸長停滞によって惹起される、Ltn1 依存的な新生ペプチド鎖分解、すなわち RQC が誘導される否か検証を行なった。通常、野生株ではプロテアソーム阻害剤 MG132 処理を行なうことでプロテアソームによって分解される新生ペプチド鎖(アレスト産物、AP: arrest product)が観察されるが、*hel2Δ*株ではアレスト産物が全く観察されなかった(図 2-4A)。*ubc4Δ*株においては僅かにアレスト産物が観察されたものの、野生株と比較して顕著に減少していた(図 2-4A)。また、*hel2Δltn1Δ*、*ubc4Δltn1Δ*二重欠損株を作製し、Ltn1 依存的な翻訳アレスト産物の分解について評価したところ、*ltn1Δ*で観察された翻訳アレスト産物の蓄積が、*hel2Δltn1Δ*二重欠損株では全く観察されなかった(図 2-4B)。MG132 処理時と同様に *ubc4Δltn1Δ*二重欠損株において顕著に減少していた。以上の結果から、Hel2 は Ltn1 依存的な翻訳アレスト産物の分解、すなわち RQC に必須な因子であることが明らかになった。Ubc4 に関しては Hel2 と比較して表現型が弱かったが、Ubc4 のパラログである Ubc5 が細胞内に発現しているためと考えられる。さらに、二重欠損株の表現型から Ltn1 の上流、すなわち RQC 複合体形成前の段階で Hel2 および Ubc4/5

が機能することが示唆された。以上の結果から、*hel2Δ*株および *ubc4Δ*株では、R(CGN)12 配列における翻訳伸長停滞が品質管理の対象として認識されないため、RQC が惹起されないと考え、次に Hel2 のリボソームとの結合を調べた。

2-3-2. Hel2-Ubc4 によるユビキチン化が RQC に必須である

酵母細胞内には Hel2 のパートナーとなる E2 ユビキチン結合酵素が Ubc4 と Ubc5 の二種類存在しており、片方の欠損株では RQC における表現型が *hel2Δ*株と比較して弱い。*ubc4Δubc5Δ*二重欠損株の作製を検討したが、Ubc4/5 は細胞内の主要なユビキチン化に関与しており、ユビキチン-プロテアソーム経路が阻害されるため、非常に増殖能が悪く場合によっては合成致死となるため、解析に用いることが困難であった(data not shown)。そこで、Hel2 によるユビキチン化が RQC に必須であるか評価するため、Hel2 の E2 との結合ドメインある RING-finger ドメインの欠失変異体(Δ RING)および点変異体(C64A/C67A)を作製した。なお点変異体(C64A/C67A)は RING-finger ドメインのシス配列のうち、亜鉛(Zn^{2+})イオンに配位するシステイン残基に点変異を挿入した。

まず作製した変異体の細胞内発現量を比較したところ、変異型 Hel2 の発現量は野生型と同等であることが確認された(図 2-5A)。そこで、次に、Hel2 の野生型もしくは変異体と R(CGN)12 レポーターを *hel2Δ*株に導入し、MG132 処理時のアレスト産物の蓄積を観察したところ、*hel2-ΔRING* 変異体および C64A/C67A 変異体を発現させた株では、空ベクターを導入した株の場合と同様に RQC によって産生されるアレスト産物が全く観察されなかった(図 2-5B)。以上の結果から、Hel2 による何らかの標的分子のユビキチン化が、RQC の惹起に必須であることが示された。また、*hel2Δ*株および *ubc4Δ*株では、R(CGN)12 配列において翻訳伸長停滞したリボソームが品質管理の対象として認識されなくなると解釈できることから、Hel2 が停滞したリボソームを認識する分子であると考え、次にリボソームとの結合能を評価した。

2-3-3. Hel2 は翻訳中のリボソームに結合する

リボソームと Hel2 との結合を評価する手法として、ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析を行なった。10-50%のショ糖密度勾配を作製し、FLAG タグを付加した Hel2 の発現株ライセートを重層した後に超遠心分離を行ない、分子の沈降係数毎に分画した。リボソームの構成因子である rRNA は吸光帯を有するため、254nm の吸光度を測定することで、RNP、40S、60S、80S、mRNA 上にリボソームが複数個存在する di-some、tri-some ~ polysome 各画分の位置情報を得ることができる。分画したサンプルからタンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット法を行ない、Hel2 の分布を評価した。その結果 Hel2 は主に 80S リボソーム～ポリソーム画分に存在し、翻訳中のリボソームと相互作用することが明らかになった(図 2-5C)。また、hel2- Δ RING 変異体および hel2-C64A/C67A 変異体もポリソーム画分に存在することを確認した(図 2-5C)。また、アフィニティー精製法により Hel2 もしくはリボソームを精製した場合にも互いに共沈することを確認した(data not shown)。以上の結果から Hel2 は RING-finger ドメイン非依存に翻訳中のリボソームに結合することが示唆された。

2-3-4. Hel2:Ubc4 のユビキチン化基質の同定

これまでの解析において、Hel2 の E3 リガーゼ活性は翻訳伸長停滞に伴う RQC に必須であること、また、Hel2 がリボソームに結合することを明らかにした。おそらく Hel2 は翻訳伸長停滞したリボソームを認識もしくは結合し、リボソーム上で何らかの基質をユビキチン化することで RQC を惹起すると考えられる。そこで、これまでに報告されている、Hel2 の基質やリボソーム上のユビキチン化基質の文献から、ユビキチン化の基質・形態の候補として以下の3つを考え、評価した。

- ①細胞質中の遊離ヒストン H3、H4
- ②停滞したリボソーム上に存在する新生ペプチド鎖(Not4, Ltn1)
- ③リボソームまたはリボソーム上のタンパク質

この仮説に基づきそれぞれの基質・形態について検証を行なった。

①細胞質中の遊離ヒストン H3、H4

Hel2 は過剰生産された細胞質ヒストンタンパク質の分解に関与することで初めて機能同定された(Singh et al., 2012)。基質であるヒストン H3 および H4 タンパク質を直接ユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進すると考えられる。ヒストンタンパク質は、酸性の分子である DNA と相互作用するため、リジン-アルギニンに富んだ高塩基性である。Hel2 が存在しない場合、細胞質の余剰ヒストンタンパク質が mRNA に結合すると予想されるため、これが RQC を阻害する可能性を検証した。しかし、Hel2 と同時に機能同定された Hel1 について *HEL1* 欠失変異株を作製し、翻訳伸長停滞効率を検証した結果、全く影響が観察されなかった(図 2-3B)。また、第 3 章において後述するが、翻訳伸長停滞に伴う mRNA 品質管理機構 No-go decay (NGD) に関しても Hel1 の欠失は影響せず、また、ヒストンタンパク質を過剰発現するマルチコピーベクターに繋いだヒストンレポーターを用いて、出芽酵母細胞内にヒストンを過剰生産した際にも、NGD の mRNA 分子内切断効率低下は観察されなかった(図 3-3C, data not shown)。以上の結果から RQC および NGD における Hel2 の基質は、ヒストンタンパク質では無いことが示唆された。

②停滞したリボソーム上に存在する新生ペプチド鎖

Dr. Frydman らの報告において、「正常 mRNA 由来の新生ペプチド鎖のうち 1-5%程度を Hel2 がユビキチン化する」というモデルが提唱された(Duttler et al., 2013)。この報告の中で *hel2Δ* 株ではユビキチン化された新生ペプチド鎖量が減少していたため、候補として検証を行なった。検証にあたり、新生ペプチド鎖がユビキチン化を受けないようなレポーターを構築した。これまで解析に用いてきた *GFP-X-FLAG-HIS3* レポーターにおいて、新生ペプチド鎖部分に相当する GFP のリジンコドン全てをアルギニンコドンに

置換した *GFP(KR)*変異体を作製しレポーターに組み込んだ。また、*GFP* タンパク質の構造が変化し、抗 *GFP* モノクローナル抗体による検出に支障が出る可能性が予想されたため、N 末端に HA エピトープタグを付加した、*HA-GFP(KR)-X-FLAG-HIS3* レポーター(以下、*GFP(KR)*レポーターとする、*X* = アレスト配列)を構築した(図 2-6A)。

*GFP(KR)*レポーターを用いて、アレスト産物の有無をウェスタンブロッティングにより解析したところ、*GFP(KR)*レポーターでは野生株において翻訳アレスト産物の蓄積が観察され、*Ltn1* による新生ペプチド鎖のユビキチン化が阻害されている可能性が考えられたものの、*Hel2* によるユビキチン化が阻害された結果とは異なる表現型を示した(図 2-6B)。実際に *asc1Δ*株と *hel2Δ*株の表現型を調べたところ、*K0* レポーターであっても翻訳アレスト産物の蓄積は見られず、*RQC* は惹起されなかった(図 2-6B)。以上の結果から、新生鎖のユビキチン化は *RQC* の惹起には関与せず、*Hel2* のユビキチン化標的分子は他に存在することが示唆された。

また、野生株においてすでにアレスト産物の蓄積が観察されていたにも関わらず、*ltn1Δ*株においては野生株よりアレスト産物が増加していた(図 2-6B)。以上の結果から、*Ltn1* は新生ペプチド鎖以外のユビキチン化に関与している可能性、メチオニン残基やシステイン残基をユビキチンしている可能性、*Ltn1* 非存在下でアレスト産物に付加されるアラニン-スレオニンテイル (CAT-tail)によってアレスト産物の蓄積が進行している可能性などが考えられたが、本研究において *Ltn1* に関しての更なる検証は行っていない。

③リボソームまたはリボソーム上のタンパク質

Hel2 はリボソームに結合するため、ユビキチン化はリボソーム上で行われると考えられる。これまでもリボソームがユビキチン化を受けることが報告されている。例えばアレスト産物の分解に関与する E3 ユビキチンリガーゼ *Not4* は、40S サブユニットの *Rps7A* をユビキチン化する(Panasenko and Collart, 2012)。また、機能欠損 25S rRNA の分

解系である 25S NRD においても GUARD 複合体と呼ばれるユビキチンリガーゼ複合体がリボソームのユビキチン化を行なうことが報告されている(Fujii et al., 2009, 2012)。さらにリボソームの選択的オートファジーであるリボファジーに必須な脱ユビキチン化酵素 Ubp3 非存在下では、ユビキチン化されたリボソームタンパク質が観察されている(Kraft et al., 2008)。

リボソーム上に存在する Hel2 のユビキチン化基質を探索するため、リボソーム免疫沈降法を用いた Hel2 のユビキチン化基質の探索実験を行なった。FLAG タグを付加したリボソーム 60S サブユニットタンパク質 Rpl25、Hel2 および Myc タグを付加したユビキチンを発現する出芽酵母形質転換株を作製し、リボソームと共沈降するユビキチン化タンパク質を、抗 Myc 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。その結果 50kDa、38kDa、30kDa 付近に Hel2 依存的にユビキチン化されたタンパク質が検出された(参考: 図 2-7A, B)。また、36kDa 付近に Hel2 非依存かつ Ubc4 依存的にユビキチン化されるバンドが観察された。当研究室修士修了生の佐藤史弥さん、東京都医学総合研究所の土屋光研究員、佐伯泰副参事研究員、田中啓二所長との共同研究により、観察されたユビキチン化タンパク質について、LC-MS/MS によるタンパク質の同定とユビキチン化された残基の決定を行なった。その結果、50kDa 付近に見られたバンドはリボソーム 40S サブユニットタンパク質 Rps3 であり、C 末端テールの 212 番目のリジン残基(K212)がユビキチン化されていた(図 2-7 B, C)。また、38kDa、30kDa 付近に見られたバンドはリボソーム 40S サブユニットタンパク質 Rps20 であり、N 末端の 8 番目のリジン残基(K8)がユビキチン化されていた(図 2-7 B, C)。また 6 番目のリジン残基(K6)がユビキチン化されているペプチドについてもデータの信頼性が低いものの観察された(data not shown)。さらに、Hel2 非依存に観察された 36kDa 付近のユビキチン化タンパク質は、Not4 の基質である Rps7A であった。Rps7A の 76 番目のリジン残基がユビキチン化されており、先行研究の結果と一致した(Panasenko and Collart, 2012)。

2-3-5. Rps3 および Rps20 のユビキチン化の検証

共同研究による LC/MS-MS 解析結果を踏まえ、Hel2 による Rps3 および Rps20 のユビキチン化が RQC に必須であるか検証するため、材料の構築を行なった。Rps3 について、ユビキチン化残基の K212 をアルギニン残基に置換した Rps3 K212R 変異体の発現プラスミドを作製した。また、Rps20 について、ユビキチン化残基の 8 番目のリジン残基(K8)に加え、近傍に位置する 6 番目のリジン残基(K6)にも置換変異を導入した、rps20-K6R/K8R 変異体の発現プラスミドを作製した。*RPS3* および *RPS20* は必須遺伝子であるため、内在遺伝子の欠損を相補できる野生型のプラスミドを *URA3* 遺伝子をマーカーとして有するベクターを用いて出芽酵母株を形質転換し、得られた形質転換体の内在遺伝子を欠失させた組み換え変異株を作製した。この変異株を rps3-K212R 変異体または rps20-K6R/K8R 変異体を発現するプラスミドを用いて形質転換し、得られた形質転換株を 5-FOA プレートに画線して、*URA3* 遺伝子を保持しない、すなわち野生型のプラスミドを持たない出芽酵母株を単離し KR 変異株とした。

まず、Rps3 と Rps20 の KR 変異株が Hel2 依存的なユビキチン化を受けないことを、基質同定の際に行なったリボソーム免疫沈降法を用いて確認した。その結果、rps3-K212R では Hel2 依存的な Rps3 のユビキチン化が、rps20-K6R/K8R では Rps20 および Rps3 の両方のユビキチン化が起きないことを確認した(図 2-8A)。

そこで次に、rps3-K212R 変異株および rps20-K6R/K8R 変異株について、さらに *LTN1* を欠失させた株を作製し、Rps3 および Rps20 のユビキチン化が RQC に必要か否か解析した。その結果、rps20-K6R/K8R 変異株では Hel2 存在下にもかかわらず翻訳アレスト効率が顕著に低下し、*ltm1* 欠損下においてもアレスト産物は観察されなかった(図 2-8B)。Rps20 の N 末欠失変異体(Δ N)においても同様の結果が観察された。一方で、rps3-K212R 変異株では依然として RQC が惹起されていた(図 2-8C)。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 を処理した条件下で観察されるアレスト産物に関して、KR 変異株を用いて同様に評価したところ、rps20-K6R/K8R 変異株および Δ N 変異株においてアレスト産物は観

察されず、RQC は惹起されなかった(図 2-8D)。また、*rps3-K212R* 変異株では野生株と比較してアレスト産物量が減少したものの、依然として RQC が惹起されていた(図 2-8E)。*rps20-K6R/K8R* 変異体の表現型は、*hel2Δ*株の表現型と全く同一であった。以上の結果から、Hel2 によるリボソーム Rps20 のユビキチン化が翻訳伸長停滞に起因する RQC に必須であることを遺伝学的に明らかにした。この結果はリボソームのユビキチン化が、品質管理機構のトリガーであることを意味する。

2-3-6. Hel2 による Rps20 ユビキチン化が RQC に必須である

Rps20 のユビキチン化が RQC の惹起に必須であることが示されたが、実際に Hel2 が停滞したリボソーム上で Rps20 を直接ユビキチン化するか否かに関しては、出芽酵母 *in vivo* の解析のみでは明らかにすることは困難であった。そこで、Hel2 による直接のユビキチン化を観察するため、*in vitro* ユビキチン化反応系を新規に構築した。ユビキチン化には E3 である Hel2 と基質となるリボソーム以外に、E2 である Ubc4、ユビキチンを活性化する酵素である E1(ヒトのリコンビナントタンパク質 UBE1 を使用)、モノマーユビキチン、および ATP が必要である。Hel2 は出芽酵母から精製し、リボソームは、HA タグを付加した Rps20 野生型または KR 変異体を発現する *hel2* 欠損株から Rpl25-FLAG により精製した。Ubc4 は出芽酵母のリコンビナントタンパク質を精製し用いた。これらのユビキチン化酵素-基質を混合し、ユビキチン化反応を行なったところ、Hel2 依存的に Rps20 の 6、8 番目のリジン残基特異的にユビキチンが付加されることが確認された(図 2-9)。以上の結果により、Hel2 によるリボソーム Rps20 のユビキチン化が翻訳伸長停滞に起因する RQC に必須であることを生化学的に証明した。

2-3-7. Rps20 ユビキチン化の特徴

基質同定の際に Rps20 のユビキチン化バンドは 2 本観察されていたため、高分子量側のバンドは di-ユビキチン化されている可能性が考えられた。また、ユビキチン化サイ

トは K6 と K8 の二箇所存在するため、これらのユビキチン化はモノユビキチンである可能性も考えられた。そこで、Myc タグを付加したユビキチン K48R 変異体および K63R 変異体を用いて、di-ユビキチン化 Rps20 のユビキチン鎖型を解析した。その結果、Myc-Ub-K48R を発現した際にダイユビキチン化 Rps20 のバンドが減少していた(図 2-10A)。また、K48 鎖のユビキチンにアフィニティーを有する抗 K48-Ub 抗体を用いて、ユビキチン化 Rps20 のバンドの観察を行なったところ、di-ユビキチン化 Rps20 に相当するバンドが検出された(図 2-10B)。以上の結果から、Rps20 の di-ユビキチンは K48 鎖である可能性が示唆された。

K48 ポリユビキチン鎖はユビキチン-プロテアソーム系による分解のシグナルとなることから、プロテアソーム阻害条件下では Rps20 のユビキチン化が蓄積する可能性を考え、MG132 処理条件下での Rps20 のユビキチン化を観察した。その結果、MG132 処理条件下においても、Rps20 のユビキチン化の亢進は観察されなかった(図 2-10C)。これは、Rps20 のユビキチン化がポリユビキチン化ではなく di-ユビキチン化であるため、プロテアソーム依存的な分解の指標ではなく、何らかのシグナルとして機能する可能性が考えられた。

一方で、以前の報告では Hel2 と K63 ポリユビキチン化が共に RQC に必須であることから、Hel2 は K63 鎖伸長を行なうことが示唆されていた(Saito et al., 2015)。そこで、ユビキチンの野生型および K63R 変異型をそれぞれの *in vitro* ユビキチン化反応系に加え、Hel2 による Rps20 のユビキチン化について観察した。その結果、Hel2 は効率的に K63 鎖伸長を行なうことが観察された(図 2-10D)。実際に細胞内では観察されなかったものの、Hel2 は K63 鎖伸長能を持つと考えられる。一方で K63R 変異体を使用した条件での Rps20 のユビキチン化パターンは *in vivo* で観察されていたバンドパターンと類似していた。以上の結果から、考えられる可能性として、一つ目に、*in vivo* でのユビキチン化を観察するために Myc-Ub を使用したが、この条件が K63 ポリユビキチン鎖を観察できなかった原因として考えられる。Myc-Ub は細胞質中及びライセート中における

脱ユビキチン化を抑制するため、ユビキチン化が観察しやすくなる。反面、内在性のユビキチンとの混合鎖を形成するため、ポリユビキチン鎖ではバンドパターンが複雑になり Myc タグのシグナルも分散してしまう。もう一つの可能性として、Hel2 は *in vivo* においてはモノユビキチン化もしくは di-ユビキチン化も、ポリユビキチン化も行なう可能性である。実際に、Rps3 の di-、tri-ユビキチン化バンドは Myc-Ub-K63R 発現時にバンドパターンが変化していた(図 2-10A)。また、最近の文献では、適切なユビキチン鎖伸長を行なうために E3 に脱ユビキチン化酵素が帯同し、間違ったユビキチン鎖を付加した場合に脱ユビキチン化することが示唆されている(Fang et al., 2016)。以上の結果および考察から、Rps20 は細胞内でモノユビキチン化もしくは di-ユビキチン化されることが明らかにされた一方で、観察されたユビキチン化が RQC において機能を持つのか、またどのような役割を担うのかに関しては、今回の解析のみでは明らかにすることはできなかった。

2-3-8. Rqt2-3-4 の検証

Hel2 による Rps20 のユビキチン化が RQC の惹起に必須であることが明らかにされたが、Rps20 のユビキチン化の機能は依然として不明である。本研究室の松尾芳隆助教による、近年の解析において、Hel2 が結合したリボソームに相互作用する 3 つの新規品質管理因子を同定している。これらは ATPase 型の RNA ヘリカーゼ活性を持つと想定される Rqt2、ユビキチン結合ドメイン CUE を持つ Rqt3、機能未知の C2HC5 型 zinc-ginger ドメインを持つ Rqt4 とリネームし(Rqt: ribosome-associated quality control trigger)、Hel2 (Rqt1)の下流で RQC の惹起、特にリボソームのサブユニット解離に関わる因子として推定している(図 2-11A)。

実際にこれらの RQT 因子の欠損株を作製し *LTN1* 欠失時のアレスト産物の蓄積を観察したところ、*rqt2Δ*株では *hel2Δ*株同様にアレスト産物が全く観察されなかった(図 2-11B)。また、*rqt3Δ ltn1Δ*および *rqt4Δ ltn1Δ*株では *hel2Δ ltn1Δ*株ほどでは無いが、*ltn1Δ*

株と比較してアレスト産物が減少していた。また、それぞれの欠損株において、R(CGN)12 レポーターの RNA レベルでの上昇は観察されなかった(図 2-11C, D)。以上の結果からも、RQT 因子は RQC の惹起に必須であり、Hel2 が結合しているリボソーム上で何らかの役割を担うことが示唆された。

RQT 因子の内 Rqt3 は CUE ドメインを有しており、ユビキチン化された Rps20 に結合することが想定される。また、Rqt4 の C2HC5 型 zinc-ginger ドメインは機能未知であるものの、zinc-ginger ドメイン自体もユビキチン結合ドメインとなる例が報告されている(Hicke et al., 2005; Hurley et al., 2006)。すなわち、Rqt 因子によって、Rps20 のユビキチン化が認識されることで活性化し、リボソームの解離を含めた RQC 機構を惹起するモデルを考えている。

今回同定された Rqt2-3-4 が Hel2 による Rps20 のユビキチン化反応に影響を与えうるか観察するため、Myc タグを付加したユビキチン発現条件下でのリボソーム免疫沈降後、得られた精製画分に対して抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった。その結果、Rqt2-3-4 は Hel2 による Rps20 のユビキチン化反応には関与しないことが明らかになった(図 2-12A)。以上の結果から、Rqt2-3-4 は Rps20 のユビキチン化の後に働く可能性が高いと考えられる。また、Rqt 因子が翻訳伸長停滞以外によって誘導される RQC、すなわちノンストップ mRNA もしくはトランケート mRNA 由来の RQC に関与するか否かに関しても確認したが、これらには関与しないことが示された(図 2-12B, C)。以上の結果から Rqt 因子は翻訳伸長停滞したリボソーム特異的に RQC を誘導する因子と考えられる。RQC を誘導するためにはリボソームのサブユニット解離が必要であることから、Rqt 因子はノンストップ mRNA における Dom34-Hbs1 のように、リボソームの解離を促進する因子である可能性が高い。今後の更なる機能解析が期待される。

2-3-9. Hel2 によるリボソーム認識機構

Hel2 による Rps20 のユビキチン化が RQC に必須であることは示されたが、Hel2 がど

のようにして停滞したリボソームを認識して結合しユビキチン化するののかに関しての基質特異性はこれまでの解析では明らかにされていない。そこで、Hel2 がどのような停滞したリボソームを認識するののかに関して、これまでのデータ・文献から検討を行った。

1). リボソームが停滞していれば Hel2 が結合しユビキチン化するモデル

図 2-5 のポリソーム解析の結果から考えられるように、Hel2 は必ずしも停滞したリボソームのみに結合するのではないと考えられる。Hel2 はリボソームと結合するが、リボソームが翻訳伸長中は、rotated state と non-rotated state の構造変換を繰り返しダイナミックに動くために、特定のユビキチン化サイトにユビキチンを付加することが困難である可能性がある。つまりこのモデルの場合、リボソームが停滞すると、Hel2 がリボソームをユビキチン化できる事できると考えられる。しかし、実際には RNA 二次構造の G-quadruplex によって生じるアレストでは RQC はほとんど惹起されない。また、ノンストップ mRNA の末端での停滞の場合も Hel2 は RQC の惹起に関与しない。このような観点からも、リボソームの停滞状況が Hel2 の基質認識に重要であり、Rps20 をユビキチン化できるコンフォメーションで停滞したリボソームのみが基質として認識されることが考えられる。

2). Hel2 がある特徴的なリボソームの停滞構造を認識してユビキチン化するモデル

以上の観点から、Hel2 は特定のコンフォメーションで停滞したリボソームのみを認識し、ユビキチン化すると考えられる。翻訳伸長中のリボソームは大きく分けて 2 つのコンフォメーションを取る。通常の状態(non-rotated state)と、回転状態(rotated state)である。前者は Classical state と呼ばれ、E サイトに結合して翻訳伸長を阻害する翻訳伸長阻害剤 cycloheximide 処理によって人工的に生成することが可能である。また、リボソームプロファイリングにおいては 28-30-mer の footprint を生成する。一方で rotated state はペプチド転移活性中心 PTC に結合し、PTC 活性を阻害するような翻訳伸長阻害剤に

よって生成される。PTC に結合し、PTC 活性を阻害する翻訳伸長阻害剤の anisomycin で処理したリボソームは、リボソームプロファイリングにおいては 21-22-mer の短い footprint を生成し、rotated state で停滞させていると考えられる(Lareau et al., 2014)。過去の文献から、*asc1*Δ株と *hel2*Δ株は anisomycin 感受性であり、また *hel2*Δ株、および *rqt2*Δ株が PTC 活性を阻害する別の翻訳伸長阻害剤 deoxynivalenol (DON)や trichothecin (TTC) 感受性株であることも明らかにされている(Kugler et al., 2016; Saito et al., 2015)。すなわち、rotated state で停滞したリボソームの解消には Asc1、Hel2 や Rqt 因子と言った翻訳伸長停滞に起因する RQC に必須な因子が、寄与していることが明らかにされている。

そこで、実際に *hel2*Δ株および *rps20-K6R/K8R* 変異株に関して anisomycin 感受性をスポットアッセイにて評価したところ、両株共に感受性を示した(図 2-13)。一方で *rps3-K212R* 株は感受性を示さなかったことから Rps3 のユビキチン化は停滞したリボソームの解消に必須でないことが示された。また、anisomycin で固定したリボソームをユビキチン化の基質として *in vitro* ユビキチン化反応を行なったところ、anisomycin 処理したリボソームのみ、ユビキチン化効率が高い結果が得られた(図 2-14 A-B)。ただし *in vitro* ユビキチン化反応系にて用いたリボソームは精製法の都合上 mRNA を咬んでいない空のリボソームを多く含むため、cycloheximide 処理したリボソームであってもユビキチン化は進行した。以上の結果から、Hel2 は rotated state で停滞したリボソームを特異的にユビキチン化する可能性が示唆された。

2-3-11. リボソームプロファイリングと新規停滞配列の解析

これまで基質として使用してきた R(CGN)12 配列は連続したレアコドンクラスターを有するため、停滞した際には rotated state になると予想された。そこで、Ingolia 博士、岩崎信太郎博士との共同研究において、当研究室の宇田川剛助教を中心に、翻訳伸長阻害剤を使用しない条件でのライブラリ作製を行なうことで、21-22-mer の短い footprint に着目したリボソームプロファイリング解析を行なった。その結果、野生株、変異株間

わず、R(CGN)12 配列の最初のレアコドンクラスターにおいて、21-22-mer の短い footprint のピークが観察された。また、野生株では R(CGN)12 配列の上流と比較して、下流の footprint の割合が顕著に低下していたのに対して、変異株ではある程度(完全回復ではないため、停滞はしているが)下流側の *HIS3* の翻訳が進行していることが示された(data not shown)。以上の結果は CGA-CGA コドンにおいて、rotated state でリボソームが停滞していることを強く示唆しており、Hel2 はこのような停滞リボソームを認識して Rps20 をユビキチン化していると考えられる。

これまで R(CGN)12 配列を用いた停滞解析では連続した塩基性アミノ酸配列が翻訳停滞に重要であることを示してきた。しかし、RQC が誘導される配列はアルギニンコドンの内 CGA もしくは CGG コドンが連続した場合のみであり、optimal codon の AGA 連続配列では全長のタンパク質量が低下、すなわち翻訳抑制は観察されたものの、RQC は惹起されなかった(図 2-15A, B)。また連続したリジン残基配列 K12 配列においては K(AAA)12、K(AAG)12 いずれにおいても RQC が惹起されたものの、K(AAG)12 では K(AAA)12 と比較して、翻訳停滞効率が低いことが観察された。これらの結果は、翻訳停滞が実際にはコドンに依存して生じることを示唆している。

そこで実際にゲノムコードの内在配列に着目し、今回のリボソームプロファイリングのデータを解析し、短い footprint を指標として新規停滞配列の探索を行なった(図 2-16A)。その結果、Grayhack 博士らが最近報告した、翻訳抑制能が高いコドンペアにおいて、短い footprint の蓄積が観察された(Gamble et al., 2016)。実際に短い footprint のスコアが高い CGA-CCG、CGA-GCG、CGA-CUG、CGA-CGA に関して、これらのコドンペアによって RQC が惹起されるか否か解析するための *GFP-(XXX-XXX)6-FLAG-HIS3* レポーターを作製し解析したところ、程度の差はあるもののすべての配列において RQC が誘導された(図 2-16B)。また、*hel2Δ* 株 *hel2Δtn1Δ* 株を用いた解析により、これらのコドンペアに起因する RQC は全て Hel2 依存的に惹起されることを明らかにした(図 2-16C)。以上の結果から、Hel2 は rotated state で翻訳伸長停滞したリボソームに基質特異性があり、

rotated state でリボソームを認識して Rps20 をユビキチン化することで RQC を惹起することが強く示唆された。

2-4. 考察

2-4-1. Hel2 による基質認識の特徴

今回 R(CGN)12 配列を用いたレポーター解析、リボソームプロファイリング、anisomycin 感受性解析等により、Hel2 が rotated state の状態で停滞したリボソームを特異的に認識し、Rps20 をユビキチン化することで、RQC を誘導することを明らかにした。実際に、これまで明らかにされている RQC 誘導性アレスト配列上でも、リボソームは rotated state で停滞する可能性が高い。

今回は連続した塩基性アミノ酸配列を有する R(CGN)12 配列をメインの停滞配列として使用し解析を行なった。一方で連続した塩基性アミノ酸配列のうち、R(AGA)12 のような読みやすいコドン(optimal codon)の連続配列では、全長の翻訳産物量が低下し、翻訳停滞は生じたものの、RQC は惹起されなかった(図 2-15A)。すなわち、連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳のアレストは RQC の誘導に十分ではないことが示され、RQC の誘導には CGA-CGA 配列のようなレアコドンクラスター配列上で、リボソームが rotated state の状態で停滞することが必要であった。連続した塩基性アミノ酸配列に起因する翻訳アレストは元々ポリ A 鎖の翻訳によって発見された(Dimitrova et al., 2009; Ito-Harashima et al., 2007)。本論文の図 2-15A において、K(AAA)12 や K(AAG)12 配列を用いた解析を行ない、これらの配列はいずれも翻訳アレストが生じること、および、Hel2 依存的に RQC が誘導されることが確認された。連続したアデニン配列はシークエンサーでは読みにくく、また内在のポリ A 鎖との区別がつかないため、リボソームプロファイリングによる解析が困難であった。そこでシークエンサーによる解析が可能な K12 配列(AAG AAA AAA AAA AAA AAG AAA AAA AAA AAG AAA AAA)を作製し、RQC が惹起されることを確認した後、リボソームプロファイリングにより短い footprint の蓄積が見られるか解析を試みたが、そのような傾向を観察することは出来なかった(data not shown)。すなわち K12 配列上でリボソームが rotated state で停滞する根拠は現在までに得られていない。また、本研究における K12 のコドン特異性解析により、AAA

の連続配列と比較して、AAG の連続配列は全長の翻訳抑制能および RQC 誘導能が低いことが示された (図 2-15A)。これは K12 配列による翻訳アレストがおよび RQC 惹起には、新生ペプチド鎖の電荷以外に、コドンの影響があることを示唆している。

細胞内やウイルス由来配列においてはしばしばプログラムされたフレームシフトが起こる。このような配列の中に、AAAAAAG のような”滑りやすい”配列下流にシェードノット構造等の mRNA の二次構造が存在するものがある(Belew et al., 2014)。K12 配列の場合も AAA または AAG が連続した配列を含むため、フレームシフトを引き起こしやすく、このような状態のリボソームが品質管理の対象となっている可能性も考える必要がある。実際にリボソームプロファイリングの解析において、ゲノムの footprint に着目し解析を行ったところ、短い footprint が蓄積する配列の中に、出芽酵母のゲノムにコードされているウイルス由来のトランスポゾン(Ty)である、*gag-pol* フレームシフト配列も含まれていた(data not shown)。フレームシフトを起こしやすい配列上では、リボソームが *rotated state* で停滞する可能性が考えられる。今後、停滞配列の機構解析を進める上で注目すべき事象であると考えている。

一方で、ノンストップ mRNA やランケート mRNA の末端で停滞したリボソームに起因する RQC には Hel2 は不要であった。これらの停滞リボソームは *rotate state* ではなく *non-rotated state* であると考えられ、Hel2 による認識、すなわち Rps20 のユビキチン化が行われないと考えられる。また、NGD 誘導配列の内 mRNA の高次構造を形成するステムループ構造等の配列は、RQC 誘導が弱いことが観察されており、mRNA の高次構造に起因する停滞の大部分は *rotate state* ではない可能性が考えられる。しかし、次章で述べるように、これらの停滞配列に起因する mRNA 品質管理機構 No-go decay (NGD) において、Hel2 は mRNA 分子内切断に必須であるため、*non-rotated state* の停滞リボソーム上においても、Hel2 は、Rps20 ユビキチン化とは異なる機構で、NGD 誘導の役割を担っていると考えられる。

2-4-2. Hel2 が結合するリボソームの電子顕微鏡構造

当研究室の松尾助教、ミュンヘン大学の Roland Beckmann 教授、Thomas Becker 博士、Christian Schmidt らとの共同研究において、Hel2 をアフィニティー精製することで共精製されたリボソームの 77%が *rotated state* であることを明らかにした。また、*in vitro* で翻訳させたリボソームに Hel2 を混合した場合でも、*rotated ribosome* は高い比率で観察された(data not shown)。同じ精製手法を用いて、リボソームのみを精製した場合は *rotated state* の割合は低いことから、Hel2 は選択的に *rotated state* のリボソームに結合していると考えられる。しかし、今回得られた電子顕微鏡構造においては、残念ながら Hel2 由来の *density* が観察されなかった。極低温電子顕微鏡構造では、構造中で 2 つ以上のコンフォメーションを取る場合や、フレキシブルに動いている場合は、その部分の *density* が低くなり観察することが困難となる。Hel2 は C 末端側ドメインに天然変性領域を持つため、一定の構造を取っておらず、構造の決定が困難である可能性が考えられる。Hel2 の結合サイト、結合特異性を明らかにする上で、今後の構造解析の進展が必須であると考えている。

2-4-3. Rps20 ユビキチン化の役割

本研究によって、Hel2 による Rps20 のユビキチン化が RQC の惹起に必須であることを明らかにした。しかし、実際にどのようなユビキチン化が RQC に必須であるかは今回の解析では明らかにできなかった。今回の解析において観察された Rps20 のユビキチン化は *in vivo* ではモノユビキチン化および di-ユビキチン化が顕著に観察された(図 2-10A)。一方で *in vitro* ユビキチン化反応系においては、Hel2 は K63 ポリユビキチン鎖を効率良く形成した(図 2-10D)。*in vitro* ユビキチン化反応系において、K63 鎖を形成できないユビキチン K63R 変異体を使用した際には、*in vivo* において観察されたユビキチン化様式と同様にモノユビキチン化および di-ユビキチン化が観察された(図 2-10D)。また、ユビキチン K63R 変異体を過剰発現させた出芽酵母株では、*hel2Δ*株と比較して効

率は低いものの R(CGA)₁₂ 配列のリードスルーが観察されることが報告されている (Saito et al., 2015)。しかし、これらの研究結果は RQC の惹起に必須な Rps20 のユビキチン化様式を明らかにしたものではなく、どの様式のユビキチン化が RQC に必須かに関しては未だ不明である。今後 RQC 惹起機構を明らかにするために、Rps20 のユビキチン化に関して現在観察されている、モノユビキチン化、K48-di-ユビキチン化、K63 ポリユビキチン化のうち、どのユビキチン化が RQC の惹起に必要であるか、解析することが必須である。また、ユビキチン化以降の分子機構を明らかにするために、Rps20 のユビキチン化(ユビキチン鎖)の具体的な機能について解析することが必要と考える。

今回観察された Rps20 のユビキチン化はモノ、di-ユビキチン化もしくは、K63 ポリユビキチン化であるため、プロテアソーム依存的な分解は誘導されず、何らかのシグナルとして機能すると考えられる(図 2-10C)。Rps20 ユビキチン化の下流で機能すると考えている Rqt2-3-4 複合体のうち、Rqt3 がユビキチン結合ドメインである CUE ドメインを保持している。Rqt3 を介して、Rqt2-3-4 複合体が Rps20 のユビキチン化を認識することが、RQC の惹起に必要であると考えられる。しかし、*rqt3Δ*株においても、弱いながらも RQC は生じていた。この結果から、Rqt3 だけでなく、Rqt2 もしくは Rqt4 も Rps20 のユビキチン化を認識している可能性が考えられる。このうち、Rqt4 は珍しいタイプの zinc-finger (ZnF)ドメインである、C2HC5 型 ZnF ドメインを保持している。C2HC5 型は機能未知であるが、ZnF ドメインの中には、ユビキチンと結合するものも報告されているため、今後の解析が期待される(Hicke et al., 2005; Hurley et al., 2006)。実際に *rqt3Δrqt4Δ*二重欠損株では RQC は起こらないことから、Rqt4 が ZnF ドメインを介して、Rps20 のユビキチン化を認識している可能性が考えられる(data not shown)。

2-4-4. 高等真核生物における RQC の意義

今回は出芽酵母を用いて機能解析を行なった。しかし今回解析対象とした Hel2 は ZNF598 としてヒトまで保存されている。ヒトオルソログである ZNF598 は、RING-finger

ドメインから zinc-finger ドメインの領域が保存されており、C 末端側ドメインの保存性が低く、Hel2 と比較して延長している(Hel2 の全長が 639 アミノ酸残基に対して、ZNF598 は 904 アミノ酸残基)(図 2-17A)。ZNF598 は C2H2 型の zinc-finger ドメインを 5 つ持ち(Hel2 は 3 つ)、翻訳開始段階において、eIF4E に結合する eIF4Ebp2、ポリプロリンモチーフに結合する GYF ドメインを持つ GIGYF2 とともに翻訳制御に関わることが報告されている(Morita et al., 2012)。本研究では、出芽酵母 *hel2Δ* 株に ZNF598 を発現させる、相補実験を行なったが、全長、保存領域のみの場合のいずれにおいても相補性は観察されなかった(図 2-17B)。これはリボソームとの結合に必須と想定している C 末領域の保存性が乏しいため、出芽酵母リボソームへの結合能が無いと考えられる。実際にヒトのリボソームは出芽酵母に比べ rRNA の配列が長く、出芽酵母とリボソーム表面の様相が異なっている。これらの rRNA extension 領域を介してリボソーム結合因子と相互作用することが想定されているため、ZNF598 もリボソームとの結合時に相互作用していると考えられる。ZNF598 は C2H2 ZnF ドメインの数も 5 つに増えていることから、rRNA extension 領域をもつヒトリボソームに適応していると考えられる。

ヒト ZNF598 の RQC における機能は解析途上にあり、今後出芽酵母の研究を踏まえてメカニズムの解析が進んでいくと考えている。また、マウス Listerin (Ltn1) の変異は神経変性様症状を呈すことから、ZNF598 の変異もしくはノックアウトマウスが神経系に何らかの影響を与えうる可能性が考えられる。本博士論文研究において明らかにした分子機構が、哺乳類での研究解析における分子基盤となること、今後の解析が進展することを期待している。

第 3 章

翻訳伸長停滞に起因する mRNA 品質管理機構 No-go decay における
E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 の機能解析

第3章 翻訳伸長停滞に起因する mRNA 品質管理機構 No-go decay における E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 の機能解析

3-1. 序論

3-1-1. mRNA 品質管理機構 No-go decay

No-go decay (NGD)は RQC と同様に、翻訳伸長停滞に起因する品質管理機構であり、mRNA を分子内切断し RNA 末端を形成することで、mRNA を迅速に分解する機構である。NGD は、ORF の途中に強固なステムループ構造を挿入したレポーターmRNA を用いた実験により発見された(Doma and Parker, 2006)。停滞したリボソームの近傍で、未知のエンドヌクレアーゼが mRNA の分子内切断を行い、それによって生じた 2 つの mRNA 断片は、3'→5'方向に RNA を分解するエキソソーム(Exosome)と、5'→3'方向に RNA を分解する Xrn1 エキソヌクレアーゼによって迅速分解される。NGD は、現在までに、ステムループ構造のみならず、Pseudo-knot や G-quadruplex などの安定な mRNA 高次構造や、レアコドンクラスター(Chen et al., 2010)、ポリ A 配列(Dimitrova et al., 2009; Kuroha et al., 2010)などのシス配列の翻訳により誘導されることが明らかにされている。また、相補配列を持つ mRNA 同士のトランス二重鎖の形成(Sinturel et al., 2015)や、酸化ストレスによって mRNA 塩基が酸化されコドン解読が困難になった場合(Simms et al., 2014)においても、NGD が惹起されることが明らかにされている。また、酵母のみならず、ショウジョウバエ培養細胞(S2 細胞)においても、翻訳伸長停滞に起因して起こる mRNA 分子内切断由来の mRNA 断片が観察されている(Passos et al., 2009)。哺乳動物細胞においては特定の tRNA の発現量が低下した際に NGD が惹起される可能性が示唆されている(Ishimura et al., 2014)。

しかし、NGD の分子機構解析は発見から 10 年経った現在においてもあまり進んでおらず、停滞したリボソームの認識機構やエンドヌクレアーゼ自身、エンドヌクレアーゼをリクルートする分子メカニズムは依然として不明である。

3-1-2. NGD における Dom34-Hbs1 の機能

翻訳終結因子 eRF1-eRF3 に構造的類似性をもつ Dom34-Hbs1 複合体はステムループ構造に起因する NGD に必須な分子として機能同定された(Doma and Parker, 2006)。しかし、後の解析において、レアコドンクラスターのような強い停滞能を持つ配列に起因する NGD では、より効率的に分子内切断産物の検出ができるようになり、Dom34-Hbs1 は mRNA 分子内切断に必須ではない可能性が示唆されていた(Chen et al., 2010; Tsuboi et al., 2012)。当研究室における以前の解析において、Dom34-Hbs1 はノンストップ mRNA およびトランケート mRNA の 3'末端で停滞したリボソームのサブユニット解離に必須であることを *in vivo* で明らかにした。また、*dom34Δ*株において、トランケート mRNA の 3'末端で停滞したリボソームに起因して mRNA 分子内切断が生じることで、トランケート mRNA の分解を促す Dead-end NGD(図 4-1)が生じることを明らかにした(Ikeuchi and Inada, 2016; Tsuboi et al., 2012)。NGD における *dom34Δ*株の表現型として、*ski2* 欠損下における 5'NGD 中間産物(トランケート mRNA)量の減少が観察されているが、これは 5'NGD 中間産物の 3'末端で停滞したリボソームに起因して Dead-end NGD が生じることで分解されたため、見かけ上減少していると考えている(Tsuboi et al., 2012)。以上から、Dom34-Hbs1 は mRNA の末端で停滞したリボソームの解離に必須な因子であり、NGD には必須でないことが示唆されている。すなわち、停滞したリボソームの認識および mRNA 分子内切断に必須な、責任分子はこれまで全く明らかにされていない。

3-1-3. エンドヌクレアーゼ

NGD は mRNA の分子内切断を伴う品質管理機構であるが、mRNA 分子内切断を担うエンドヌクレアーゼはこれまで明らかにされていない。これまでに、*in vitro* における実験で Dom34 ドメイン I にエンドヌクレアーゼ活性があることが報告された(Lee et al., 2007)が、出芽酵母 *dom34* 欠損株を用いた *in vivo* 解析では依然として mRNA 分子内切

断が生じていることから、少なくとも *in vivo* においては Dom34 がエンドヌクレアーゼである可能性は低いと考えられている(Tsuboi et al., 2012)。一本鎖 RNA エンドヌクレアーゼとして機能が明らかにされている分子は PIN ドメインを保持している。PIN ドメインの活性中心は 3 つのアスパラギン酸残基によって構成され、構造的に近位に位置するように構造を形成する。PIN ドメインはタンパク質の一次配列から予想することは難しく、既知のエンドヌクレアーゼと一次配列の相同性が高い場合でも、実際の構造は活性中心残基が離れており、ヌクレアーゼ活性を有しない場合が報告されている。例えば、出芽酵母 18S rRNA の成熟化過程に必須なエンドヌクレアーゼである Utp24 のパラログとして Utp23 があるが、UTP23 の PINc ドメインはエンドヌクレアーゼ活性を保持していない(Lu et al., 2013)。また、哺乳類の NMD において mRNA 分子内切断を担う SMG6 は PIN ドメインを持つが、SMG5 の PINd ドメインは活性中心残基が互いに離れており、エンドヌクレアーゼ活性を有していないことがわかっている(Glavan et al., 2006)。先行研究において、既知の PIN エンドヌクレアーゼが NGD に関与しないことが明らかにされており、機能同定されていない未知のエンドヌクレアーゼが NGD に関与すると考えている。もしくは、リボソームタンパク質や rRNA が mRNA を切断している可能性が推測できるが、その分子・機能の同定には至っていない。

3-1-4. RQC と NGD の共通点と相違点

翻訳伸長停滞に起因するタンパク質品質管理機構 RQC と mRNA 品質管理機構 NGD は、基本的に同じ基質、すなわち停滞したリボソームによって惹起される。しかし、同一の停滞リボソーム上で、双方の経路が同時に惹起されるか否かはわかっていない。RQC は NGD と比較してより強い翻訳伸長停滞が生じた場合でないと惹起されない。例えば mRNA 高次構造に起因する翻訳伸長停滞は NGD を惹起するが、RQC の惹起効率は極めて低い。また、前章において、RQC は、rotated ribosome を Hel2 が認識して Rps20 をユビキチン化することで、開始されることを明らかにしたが、NGD における Hel2 の

機能はこれまで明らかにされていなかった。当研究室の以前の解析によって、Hel2 と同様のスクリーニング系によって同定された Asc1/RACK1 が NGD にも重要であり、*asc1* 欠損株においては 5'NGD 中間産物の量が低下することが確認されていた(Kuroha et al., 2010)。そこで本研究では NGD における Hel2 の機能解析を行うことで、RQC 同様に Hel2 が停滞したリボソームの認識に寄与し、ユビキチン化によって mRNA 分子内切断が惹起されると考え解析を行った(図 3-1)。

3-2. 目的

本項では、レアコドンクラスター等による翻訳伸長停滞によって生じる RQC に必須な因子 Hel2 について、同じく翻訳伸長停滞に起因する mRNA 品質管理機構 NGD における機能を明らかにするとともに、これまでに提唱されてきた NGD 分子機構との相違点を考察することを目的とした(図 3-1)。また、Asc1/RACK1 や RQT 因子等の他の品質管理因子の解析結果と比較検討し、NGD における相互関連性について検証を行なった。

3-3. 結果

3-3-1. Hel2 および Ubc4 は NGD における mRNA 分子内切断に必須である。

NGD の解析には、RQC の解析で用いた R(CGN)12 レポーターを使用した(図 3-2A)。NGD 機構では mRNA が停滞したリボソームの近傍で分子内切断された後、exosome および Xrn1 エキソヌクレアーゼによって迅速に分解されるため、通常野生株では分子内切断産物を検出することは出来ない。そこで、それぞれの mRNA 分解中間産物を観察するため、5'側中間産物を検出する際は *ski2Δ*株を、3'側中間産物を検出する場合は *xrn1Δ*株を使用した。Ski2 は Ski2-3-8-8 ヘテロ四量体(Ski 複合体)の構成因子で RNA ヘリカーゼ活性を有する(Halbach et al., 2013)。Ski 複合体はエキソソームと結合し、Ski2 によってほどかれた RNA をエキソソームが分解する。また、近年 Ski 複合体-exosome が結合したリボソームの極低温電子顕微鏡構造が解かれ、Ski 複合体がリボソームと exosome の相互作用に必須であることが示唆されている(Schmidt et al., 2016)。以上から、*ski2Δ*株では exosome の活性が阻害され、5'側中間産物が観察できる。

まず、*ski2Δ*株に関して、R(CGN)12 レポーター由来の 5'NGD 中間産物を GFP プロローブを用いたノーザンブロッティングにより検出し、効率良く分子内切断を受けていることを確認した(図 3-2B)。また、*xrn1Δ*株に関して、3'NGD 中間産物を HIS3 プロローブを用いたノーザンブロッティングにより検出した(図 3-2C)。NGD において Hel2 が関与するか否か調べるため、*ski2Δhel2Δ*二重欠損株を用いて、ノーザンブロッティングを行っ

たところ、5'NGD 中間産物が全く観察されなかった。同様に *xrn1Δhel2Δ*二重欠損株においても 3'NGD 中間産物が全く観察されなかった。以上の結果から、Hel2 は RQC と同様に NGD にも必須な分子であることが明らかになった。

また、R(CGN)12 レポーターおよび K(AAA)12 レポーターに関して、野生株および *hel2Δ*株における mRNA 半減期を調べた(図 3-2D)。アレスト配列を持たないレポーターでは野生株と *hel2Δ*株で半減期に差が見られないのに対して、R(CGN)12 レポーターでは野生株での半減期が 4.9 ± 0.4 分であったのに対して、*hel2Δ*株では 7.6 ± 0.4 分と有意に半減期が上昇した。また、K(AAA)12 レポーターでは、野生株での半減期が 4.3 ± 1.1 分であったのに対して、*hel2Δ*株では 11.2 ± 2.9 分であり、R(CGN)12 レポーターと同様に有意に半減期が上昇した。以上の結果から、Hel2 依存的な mRNA 分子内切断は母体の全長 mRNA の効率的な分解に寄与していることが明らかになった。

Hel2 は E3 ユビキチン化酵素であり、E2 ユビキチン結合酵素 Ubc4 が Hel2 の E2 酵素として機能することが明らかにされている(Singh et al., 2012)。そこで、Ubc4 および Ubc4 の相同分子種である Ubc5 に関して NGD における機能を解析するため、*ski2Δubc4Δ*および *ski2Δubc5Δ*二重欠損株を作製し、各株における 5'NGD 中間産物を GFP プローブを用いたノーザンブロッティングにより検出した。その結果、*ski2Δubc4Δ*二重欠損株において 5'NGD 中間産物が観察されなかった(図 3-2E)。一方、*ski2Δubc5Δ*二重欠損株では依然として mRNA 中間産物が観察された。前章で述べたように Ubc4 と Ubc5 は細胞内の発現量に差があり、Ubc4 の発現量が多いことから、*ubc5Δ*下では影響が観察されなかったと考えられる。同様に *xrn1Δubc4Δ*二重欠損株を作製し、各株における 3'NGD 中間産物を HIS3 プローブを用いたノーザンブロッティングにより検出したところ、*xrn1Δubc4Δ*二重欠損株において 3'NGD 中間産物が観察されなかった(図 3-2F)。以上の結果から、Hel2 および Ubc4 は NGD における mRNA 分子内切断に必須であることが示唆された。

3-3-2. Rps20 および Rps3 のユビキチン化は mRNA 分子内切断に必要ではない

RQC 惹起において、Hel2 は停滞したリボソームの Rps20 をユビキチン化する。そこで、NGD においても Rps20 のユビキチン化が必須か否か確かめるため、*ski2Δ*または *xrn1Δ*株と *rps20* の二重変異株を作製し、ノーザンブロットィングにより NGD 中間産物の検出を行った。その結果、二重変異株においても依然として、mRNA 分解中間産物が観察されたことから、mRNA 分子内切断において、Rps20 の N 末端 6 番目のリジン残基および 8 番目のリジン残基のユビキチン化は必要ないことが明らかになった(図 3-2B, C)。また、驚くべきことに、*rps20-K6R/K8R* 変異体では、*RPS20* 野生株と比較して、5'NGD 中間産物の長さが短くなっており、反対に 3'NGD 中間産物の長さはより長くなっていた。さらに、mRNA 中間産物の量が *RPS20* 野生株と比較して、顕著に増加しており、mRNA 分子内切断効率が顕著に上昇している結果が得られた。以上の結果から、Rps20 のユビキチン化は切断そのものには不要だが、mRNA の切断サイトの決定に影響を与えることが明らかになった。

確かに R(CGN)12 レポーター由来の全長タンパク質量は、*rps20-K6R/K8R* 変異体では *RPS20* 野生株と比較して顕著に増加しており、R(CGN)12 配列のリードスルーが生じていることがわかる(図 2-8B)。しかし、リボソームプロファイリングの解析では *rps20-K6R/K8R* 変異体においても CGA コドン上で短い footprint のピークが観察されていることから、効率よくリボソームが停滞していることが考えられる。すなわち、*rps20-K6R/K8R* 変異体ではリボソームの翻訳停滞は野生株と同様に CGA コドン上で起こっているが、Rps20 がユビキチン化されないことで、RQC が誘導されない場合、おそらく、リボソームの解離が行われない場合には、最初に停滞したリボソームの近傍で mRNA 分子内切断が生じず、そのリボソームより上流で停滞したリボソームに起因して mRNA 分子内切断が生じていると考えられる。

Hel2 は Rps20 以外に、Rps3 もユビキチン化することを明らかにしたが、Rps3 のユビキチン化は RQC には不要であった。NGD において Rps3 のユビキチン化が関与するか

否か調べるため、*ski2Δrps3Δ*二重変異株を作製し、ノーザンブロッティングにより 5'NGD 中間産物の検出を行った。その結果、*rps3-K212R* 変異株においても依然として 5'NGD 中間産物が観察された(図 3-3D)。すなわち、Rps3 のユビキチン化は NGD にも関与しないことが明らかになった。また、Hel2 は新生鎖のユビキチン化に関与することが報告されていたため(Duttler et al., 2013)、新生鎖のユビキチン化が NGD に関与するか否か確かめるため、新生鎖のすべてのリジン残基をアルギニンに置換したユビキチン化を受けないレポーター(*GFP(KR)*)を用いて解析を行った。その結果、新生鎖がユビキチン化を受けない場合においても、mRNA 分子内切断が生じることが明らかにされた(図 3-3E)。以上の結果から、NGD に必須な Hel2 のユビキチン化基質は今回明らかにすることができなかった。

3-3-3. Rqt2 は mRNA 分子内切断サイトの決定に影響を与える。

前項において RQC に必須な Hel2 およびその E2 である Ubc4 が NGD における mRNA 分子内切断に必須であることを明らかにした。ここで、RQC に関与する他の因子が NGD に関与する否かを検証した。まず、Hel2 による Rps20 ユビキチン化の後に機能すると考えられる Rqt2-3-4 複合体が、NGD に関与するか否かを明らかにするため、欠損株を作製し、ノーザンブロッティングにより検証した。その結果 *ski2Δrqt2Δ*、*ski2Δrqt3Δ*、*ski2Δrqt4Δ*いずれの欠損株においても、mRNA 分子内切断は生じていた(図 3-3A)。しかし、*xrn1Δrqt2Δ*株においては、3'NGD 中間産物が長くなっていることが観察された(図 3-3B)。この表現型は *rps20-K6R/K8R* 変異株と同様であることから、RQC 惹起機構において、Rps20 のユビキチン化が起きない、もしくはユビキチン化が Rqt 複合体によって認識されない場合においては、NGD 機構において、mRNA 分子内切断サイトがより上流側(*GFP* 側)にシフトすると考えられる。すなわち、リボソームの解離が mRNA 分子内切断に必須である可能性が示唆された。今回の解析では Rqt3 および Rqt4 の NGD における表現型は観察されなかったが、RQC の解析と同様、*rqt3Δrqt4Δ*二重欠損株では表

現型が見られる可能性がある。

また、タンパク質品質管理機構に関与する他の E3 ユビキチン化酵素に関しても、NGD における表現型を評価した。Hel2 と同様に、細胞質中に過剰生産されたヒストンタンパク質の分解に重要な E3 である Hel1、RQC において新生鎖のユビキチン化を担う Ltn1、Ltn1 同様に停滞したリボソーム由来のアレスト産物の分解に関与する Not4、および N 末端のアミノ酸残基によってそのタンパク質の半減期を概ね決定されるというタンパク質分解ルール”N-end rule”、およびナンセンス変異によって生じた異常タンパク質の分解機構 NMPD に関与する Ubr1 に関して、mRNA 分子内切断における影響を欠損株により評価したが、いずれも、NGD には不要であることが明らかになった(図 3-3C)。以上の結果から、Rps20 のユビキチン化および Rqt 複合体がプライマリーに停滞したリボソーム近傍での mRNA 分子内切断に重要であることが示唆された。

3-3-4. 切断サイトの同定とメカニズムの検証

これまでの解析から、*rqt2Δ*株および、*rps20-K6R/K8R* 変異株において、分子内切断サイトが変化する結果が得られた。R(CGN)12 レポーター上で生じる mRNA 分子内切断の切断サイトを塩基レベルで決定するため、3'NGD 中間産物の 5'末端をプライマーエクステンション法により決定した。まず、野生株においても、3'NGD 中間産物様のバンドが観察されたが、これは、Xm1 が停滞したリボソーム部分まで削り込んだものであり、実際の切断サイトを示すものではない(図 3-4 黒矢頭)。リボソームプロファイリングによって、R(CGN)12 配列で停滞したリボソームの多くは R3(CGA)コドンが A サイトに存在するときに rotated state で停滞することが示唆されているため、実際に配列上にマップした際に、野生株で観察された 5'末端が停滞したリボソームの端に位置することが明らかになった。一方 *xrn1Δ*株では野生株と異なり、停滞したリボソームの内側、もしくは上流で切断されていた(図 3-4 赤矢頭)。上流での切断サイトはプライマリーに停滞したリボソームより後続のリボソームの停滞に起因するものと考えられる。また、

*rqt2Δ*株および、*rps20-K6R/K8R* 変異株においては切断サイトが顕著に変化し、より上流側で切断されていることが明らかになった。また、その主要な切断サイトがおおよそ rotated state のリボソーム 1 つ分毎に出現していることから、*rqt2Δ*株および、*rps20-K6R/K8R* 変異株においては RQC が誘導されず、より長い時間 mRNA 上でリボソームが停滞することにより、多くのリボソームが mRNA 上に蓄積するため上流での切断が亢進すると考えられる。また、mRNA 分子内切断産物が観察されなかった *asc1Δ*、*hel2Δ*各株においては、プライマーエクステンションによるバンドは観察されなかった。以上の結果から、確かに Rqt2 および Rps20 のユビキチン化は NGD における mRNA 分子内切断サイトの決定に影響しており、リボソームの停滞および RQC の惹起(恐らくリボソームの解離)と NGD は関連があることが示唆された。

3-3-5. Hel2 のドメイン解析

NGD の mRNA 分子内切断に Hel2 が必須であることを明らかにしたが、既知のユビキチン化基質は mRNA 分子内切断には必須でないことが示された。また、*hel2Δ*株の表現型と *rps20-K6R/K8R* 株及び *rqt2Δ*株の表現型が異なることから、Hel2 は NGD において、RQC とは異なる機構で mRNA 分子内切断を惹起する可能性が示唆された。そこで、NGD を惹起するために重要な Hel2 のドメインを明らかにするため、ドメイン解析を行った。Hel2 は、E2 と相互作用しユビキチン化に関与する RING-finger ドメインと、3 つの C2H2 型 zinc-finger (ZnF)ドメインを持つ。また、C 末端ドメインにプロリンに富んだ配列を持つ。C 末端ドメイン(316-639 アミノ酸残基の領域)のほとんどは天然変性領域であり一定の構造を形成していないと考えられる。これらを考慮して、Hel2 変異体を作製し、RQC、NGD および Rps20 のユビキチン化能に関して解析を行った(図 3-5A)。

まず、RQC を惹起するか否かに関して、R(CGN)12 レポーターを用いたウェスタンブロットティングにより解析したところ、全長および、1-539、61-539 の変異体において、RQC 誘導能が認められた(図 3-5B)。一方で、RING-finger ドメインの変異体や、高等真

核生物との保存領域(61-315 アミノ酸領域)のみでは RQC を惹起することはできなかった。また、Hel2 変異体の各発現量を比較したところ、1-60 領域を欠失した変異体では発現量が顕著に低下していたことから、Hel2 の安定性に影響を与えている可能性が示唆された(図 3-5C)。しかし 61-539 変異体は発現量が低いながらも、RQC の惹起は可能であった。以上の結果から、Hel2 の 61-539 領域は RQC の惹起に十分であることが明らかになった。また、リボソームタンパク質のユビキチン化能に関して、各変異体を発現する株のリボソーム精製サンプルに関して、ウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、RQC と同様に、全長および 1-539、61-539 の変異体のみリボソームのユビキチン化、特に Rps20 のユビキチン化能を持つことが明らかになった(図 3-5D)。すなわち、61-539 は Rps20 のユビキチン化に十分な領域であることが明らかになった。

一方で NGD の惹起に十分な Hel2 のドメインをノーザンブロッティングにより解析したところ、Rps20 のユビキチン化および RQC の惹起に十分な領域よりも短い、1-315 および 61-315 の領域のみで NGD を惹起できることが明らかになった(図 3-5E)。61-315 の領域は RING-finger ドメインから 3 つめの ZnF ドメインまでを含む、哺乳類まで保存された領域である。Hel2 が 61-315 領域のみで NGD を惹起できるということは、RQC 惹起における Hel2 の機能すなわち Rps20 のユビキチン化とは完全に異なるメカニズムで、NGD を惹起すると考えられる。実際、61-315 領域を発現する株におけるリボソームのユビキチン化はバックグラウンドレベルであり、Rps20 のユビキチン化能はないと考えられる(図 3-5D)。また、バックグラウンドレベルのユビキチン化タンパク質に関してマス解析を行ない、新規のユビキチン化基質探索を試みたが決定することはできなかった。しかし、RING-finger ドメインが必須であること、Ubc4 が必須であることから、Rps20 とは異なる基質をユビキチン化することが NGD に必要であることが示唆された。

3-3-6. Asc1 との機能関連

Hel2 は出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニング(*NAD* スクリーニング)によって効

率的な翻訳伸長停滞に必須な因子として同定された。当研究室では同じスクリーニング系でリボソーム 40S サブユニットタンパク質である Asc1/RACK1 を以前同定している。Asc1 は Hel2 同様に RQC に必須な因子であり、NGD においても mRNA 分子内切断効率に影響を及ぼすことが明らかにされている(Kuroha et al., 2010)。しかし、これまで、Hel2 と Asc1 の関係は明らかにされておらず、その機能関連性は不明なままであった。そこで本研究ではまず、*asc1Δhel2Δ* 二重変異株を作製し、NGD および翻訳伸長停滞における表現型を観察した。*asc1* 欠損下では 5'NGD 中間産物量が顕著に低下し、中間産物の長さが短くなるが、*hel2* 欠損下では 5'NGD 中間産物は観察されなかった(図 3-6A)。二重欠損株においても切断産物がほとんど観察されなかった。また、翻訳伸長停滞においても、二重欠損株の表現型は *asc1* および *hel2* とほぼ一致したことから、Asc1 と Hel2 は少なくとも一部は、同一の経路上で機能している可能性が示唆された(図 3-6B)。

次に、*asc1* 欠損下における Hel2 の発現量を調べたところ、野生株と比較して 5 倍程度減少する結果が得られた(図 3-6C)。一方で、*asc1* 欠損下における *HEL2* mRNA の発現量は野生株と比較してほとんど変わらないか僅かに上昇していたことから、*asc1* 欠損下においては、Hel2 のタンパク量が低下していることが明らかになった(図 3-6D)。

asc1 欠損下において、Hel2 はリボソームとの安定な結合が出来ず、分解されている可能性が考えられた。そこで、Hel2 とリボソームとの結合能をポリソーム解析により調べたところ、*asc1* 欠損下では発現量は低下していたものの、依然としてポリソームに結合することが明らかにされた(図 3-6E)。しかし、Hel2 の発現量が顕著に低下していることから、迅速に分解を受けている可能性が考えられる。

最後に、*asc1* の欠損が Hel2 によるリボソームのユビキチン化効率に影響を与えている可能性を考え、RQC に必須であることが明らかにされている Rps20 のユビキチン化に関して検証を行った。*in vivo* における Rps20 のユビキチン化を観察したところ *asc1* および *hel2* 欠損下では Rps20 のユビキチン下レベルが低下していた(図 3-7A)。また、*asc1* 欠損株からリボソームを精製し、*in vitro* ユビキチン化反応を行ったところ、Asc1

を持たないリボソームでは Hel2 による Rps20 のユビキチン化効率が顕著に低下していた(図 3-7B)。以上の結果から、Asc1 は Hel2 による Rps20 の効率的なユビキチン化に寄与しており、Hel2 がリボソームに結合する上での足場の一部として機能するか、もしくは WD40 リピートドメインのユビキチン結合能を活かした効率的なユビキチンのリクルートに寄与している可能性が考えられる。また、*asc1* 欠損株に Hel2 を過剰発現した場合に、mRNA 分子内切断活性が回復し、相補されることを見出した(図 3-7C)。現在までに NGD に必須な Hel2 のユビキチン化基質は未同定であるが、この結果は未知の基質が存在する可能性を示唆していると考えられる。

3-3-7. Hel2 は Dead-end NGD における mRNA 分子内切断に重要である。

NGD における mRNA 分子内切断によって産生される 5'側の“トランケート mRNA”は、キャップ構造および開始コドンを持つが、終止コドン及びポリ A 鎖を持たないノンストップ mRNA であるため、NSD によって分解される。しかし、*dom34* 欠損下のように末端で停滞したリボソームが解離しない状況下では、mRNA 上にリボソームが蓄積し、停滞したリボソームをトリガーとして、mRNA 分子内切断が惹起される。この機構を Dead-end NGD と呼ぶ(図 4-1)。Dead-end NGD では分子内切断によって RNA 断片が生成される。後述する第 4 章において、この断片の生成に Asc1 が必須であることが明らかにしている(Ikeuchi and Inada, 2016)。本章では Dead-end NGD における mRNA 分子内切断に Hel2 が関与するか否かに関して確認した。その結果 *hel2(rqt1)* 欠損株においては mRNA の断片化が顕著に抑制されていることが明らかになった(図 3-8 A-B)。また、切断によって生じた断片 mRNA の 5'末端をプライマーエクステンション法により決定することにより、切断サイトを決定した(図 3-8 C-D)。その結果、mRNA の断片化はおよそリボソーム 1 個分ごとに生じており、今回の解析で得られた最も短い断片(70~ nt)はリボソームが 3 個停滞した際に切断されて生じることが示唆された。またシグナルが弱いながらも、リボソームが 4 個、5 個、6 個停滞した位置に相当するバンドも観察さ

れた(図 3-8D 赤線部)。これらのバンドは *hel2* 欠損株や *asc1* 欠損株では観察されなかったことから、Asc1 と Hel2 は Dead-end NGD における mRNA 分子内切断に必須もしくは極めて重要であることが示唆された。

3-3-8. Hel2 は環境・配列依存的な多種多様な NGD を惹起する

NGD は R(CGN)₁₂ 配列のみならず、末端で停滞したリボソームによっても惹起されることを見出した。また、これらの条件において NGD の惹起には Hel2 が重要であることが明らかにされた。しかし、これまでの解析はすべてレポーター遺伝子を用いており、ゲノムにコードされている遺伝子由来の mRNA が NGD によって分解されるか否かに関しては解析していなかった。そこで特定のアミノ酸を欠乏させた条件下では、特定のコードンでリボソームが停滞すると想定し、実験系を構築した。61 種類のセンスコードンのうちアミノ酸への割当てが最も少ないトリプトファンコードン UGG に着目し、UGG コドンが少ない、かつ適当な位置にあるような mRNA として *PGK1* mRNA を選択した。*PGK1* mRNA は 925 nt および 1,000 nt の 2 箇所だけに UGG コドンを持つため、トリプトファン欠乏条件下では、2 箇所のコードンのいずれかで翻訳伸長停滞を引き起こし、仮に mRNA が分子内切断を受けた場合には切断産物が観察しやすいと考えた(図 3-9 A)。そこで、5'NGD 中間産物を観察するため *PGK1* 1-500 nt 領域に相補するプローブを作製し、*ski2* 欠損下でトリプトファンを欠乏させたところ、5'NGD 中間産物と思しきバンドが明確に観察された。また、*ski2Δhel2Δ*株ではこのバンドが観察されなかったことから、観察された mRNA 断片は 5'NGD 中間産物であり、Hel2 依存的に、トリプトファンコードン上で停滞したリボソームの近傍で mRNA が分子内切断を受けることが明らかになった(図 3-9 B)。一方、同様のトリプトファン欠乏条件下で RQC が起こるか否かをウエスタンブロッティングにより観察したが、*ltn1* 欠損株においてもアレスト産物は検出されなかった(図 3-9 C)。以上の結果から、アミノ酸欠乏条件下では Hel2 依存的に mRNA 分子内切断が惹起されること明らかにした。

また、他のアレスト配列 K(AAA)₁₂ 配列、R4(CGG CGA CGA CGG)配列、G-quadruplex 構造、を持つようなレポーター遺伝子を用いた解析においても、効率には差があるもののすべてにおいて mRNA 分子内切断が生じること、また、その切断が Hel2 依存的であることを明らかにした(図 3-10 A-B)。

3-3-9. Hel2:Ubc4 は NSD、NMD には関与しない

Hel2 は翻訳伸長阻害を受けたリボソームを認識して、NGD と RQC を引き起こすと考えられるが、NGD と同様にリボソームが mRNA を翻訳することで起こる mRNA 品質管理機構である NMD および NSD においても Hel2 が関与するか検証した。まず、NSD について検証した。NSD は終止コドンを持たないノンストップ mRNA の分解系である。ノンストップ mRNA はポリ A 鎖を持つものと持たないものの 2 種類に大別される。前者は ORF 中での早期ポリ A 付加等によって産生される。ポリ A 鎖をポリリジンにコードするため、ポリ A 鎖を翻訳したリボソームは翻訳アレストを引き起こし mRNA 分解を引き起こす。後者は NGD によって産生される 5'側中間産物など、ORF の途中で切断されて生じたトランケート mRNA である。Ski7、および Dom34/Pelota-Hbs1 が、翻訳終結因子の代わりに停滞したリボソームの A サイトに入りリボソームを解離することで、NSD が開始されると考えられている。そのため Dom34-Hbs1、Ski2 等の NSD に関与する因子の欠失変異株ではノンストップ mRNA の半減期が長くなる(van Hoof et al., 2002; Tsuboi et al., 2012)。

Hel2 および Ubc4 について NSD における活性を検証するため、2 種類のノンストップ mRNA について半減期測定を行なった(図 3-11 A-B)。出芽酵母 *HIS3* mRNA の終止コドンを欠失したポリ A 鎖を持つノンストップ mRNA、*HIS3-NS* と、*GFP* の下流にハンマーヘッドリボザイム(*Rz*)配列を付加することで、翻訳非依存に自己内部切断が生じ、ポリ A 鎖を持たないトランケート mRNA を生成する *GFP-Rz* mRNA の 2 種類を用いて半減期測定を行なった。その結果 *hel2* 欠損株および *ubc4* 欠損株では、いずれのノンスト

ップ mRNA においても半減期の上昇が見られなかった(図 3-11 A-B)。一方で *asc1(rack1)*Δ 株では半減期のわずかな上昇が観察されたが有意差は見られなかった。以上の結果から、Hel2 および Ubc4 は NSD に関与しないことが明らかになった。

次に NMD に関して検証した。NMD は、通常の終止コドンより上流にナンセンス変異等によって生じた未成熟終止コドン(PTC: premature termination codon)をもつ mRNA において PTC での異常翻訳終結を認識して mRNA を分解する機構である。ヒトを含む高等真核生物の NMD 分子機構は非常に良く解析されているが、出芽酵母の長い 3'UTR に起因する NMD 分子機構は、Upf 複合体のリクルート機構も含め多くの点が未解明である。NMD に必須な Upf1 をコードする遺伝子(*NAM7/UPF1*)を欠失した変異株では NMD に欠損を示し野生株と比較して mRNA 半減期が長くなる(Kuroha et al., 2009)。この現象を観察することで NMD における Hel2 の活性を検証するため、野生株(WT)、*upf1* 欠損株、*asc1(rack1)*欠損株、*hel2* 欠損株および *ubc4* 欠損株について NMD を受ける mRNA の半減期を測定した。NMD を受ける mRNA レポーターとして、出芽酵母 *HIS3* mRNA の 100 番目のコドンを終止コドンに置換した *HIS3-PTC* mRNA を使用した(図 3-11C)。その結果、*asc1* 欠損株、*hel2* 欠損株および *ubc4* 欠損株における *HIS3-PTC* mRNA の半減期は野生株とほぼ同等であった(図 3-11 C)。以上の結果から、Asc1、Hel2 および Ubc4 は NMD には関与しないことが明らかになった。すなわち、Hel2 および Ubc4 は NGD-RQC にのみ特異的に関与する因子であり、他の mRNA 品質管理機構には関与しないことが明らかになった。

3-3-12. Dom34 との機能関連

Dom34-Hbs1 は当初、NGD において mRNA 分子内切断を促進する因子として同定された。しかし、その後、Dom34-Hbs1 は NSD に関与する因子であり、末端で停滞したリボソームの解離に関与することが明らかにされた(Tsuboi et al., 2012)。実際に、Dom34 が翻訳伸長停滞に起因する品質管理機構 RQC および NGD に関与しないことを確認す

るため、*dom34* 欠損株を用いた解析を行った。確かに *dom34* 欠損株においても R(CGN)12 配列に起因する RQC は生じており(図 3-12A)、NGD においても 5'NGD 中間産物が観察された(図 3-12B)。以上の結果から Dom34 は翻訳伸長停滞に起因する品質管理機構には不要であることが確認された。また、*dom34ΔhelΔ2* 二重欠損株を作製し、同様に表現型を確認したところ、RQC、NGD いずれにおいても、*hel2Δ*株と同様の表現型であった。以上の結果から、翻訳伸長停滞に起因する RQC および NGD には Dom34-Hbs1 は必要なく、Hel2 が 2 つの品質管理機構の惹起に必須な因子であることが示された。

3-4. 考察

3-4-1. NGD における Rqt2 と Rps20 のユビキチン化の役割

今回の解析において、Rqt2 および Rps20 ユビキチン化のいずれかが欠損した条件下では、mRNA の分子内切断サイトが通常より上流側にシフトする結果が得られた。Rps20 のユビキチン化は Hel2 によって行われる RQC に必須な反応である。また、Rqt2 は同じく RQC に必須な因子であり、Rqt3-Rqt4 と Rqt 複合体を形成し、RQC 複合体形成の前段階、すなわちリボソーム解離のステップで何らかの機能を持つと推定している。Hel2 存在下においても、Rqt2 および Rps20 ユビキチン化のいずれかが欠損した条件下では、停滞したリボソームがサブユニットに解離しないと推察でき、リボソームのサブユニットが解離しない場合、停滞したリボソームの近傍での mRNA 分子内切断が惹起されないと考えられる。すなわち、停滞したリボソームの近傍での mRNA 分子内切断の惹起には、リボソームの解離が必須である可能性が考えられる。実際、プライマーエクステンション法により明らかにした正常な mRNA 分子内切断サイトは、停滞したリボソームの P サイトの位置に存在しており、80S の状態では RNase が作用することは困難であることから、サブユニット解離後に mRNA 分子内切断が生じる可能性を示唆していると考えられる(図 3-4)。また、Rqt2 もしくは Rps20 ユビキチン化のいずれかが欠損した条件下では分子内切断サイトがより上流側にシフトしたが、サブユニット解離できずに「停滞したリボソーム」が前方にすることで、後ろから翻訳してきたリボソームが停滞し、通常より上流側で mRNA 分子内切断が惹起されたと考えられる。

しかし、*ltn1* 欠損株や、新生鎖のリジン残基をすべてアルギニン残基に置換し、60S 上での Ltn1 依存的なユビキチン化を阻害した場合は、正常に NGD が生じた(図 3-3)。以上の結果から、解離した後の 60S 上での基質ユビキチン化を阻害しても NGD に影響はなく、mRNA からリボソームが解離する段階を阻害すると、停滞したリボソーム近傍での NGD が阻害されると考えられる。すなわち、リボソームのサブユニットへの解離が、正しい位置での mRNA 分子内切断に必須であると考えられる。

今回の結果はリボソームの解離が mRNA 分子内切断の惹起に必須である可能性が示唆されており、mRNA 分子内切断が解離した 40S 上で生じる可能性が考えられる。mRNA は通常リボソーム 40S サブユニットに存在する mRNA トンネルの中を通過しており、プライマーエクステンションで決定した切断サイトで mRNA が切断されるためには、E サイトにエンドヌクレアーゼが結合するか、リボソームタンパク質や rRNA が直接切断に関与するか、もしくは、解離したリボソーム 40S サブユニット上で分子内切断が生じる必要がある。また、40S サブユニットをリサイクルするためには mRNA の分解が必要であると考えられる。リボソームの解離が阻害された場合においては、上流側で mRNA の分子内切断が生じていることから、上流側で Rps20 ユビキチン化および Rqt2 非依存のリボソーム解離が生じているか、リボソームの解離非依存の mRNA 分子内切断機構が生じている可能性が考えられる。

3-4-2. Hel2 の機能

NGD における mRNA 分子内切断には Hel2 の 61-315 領域があれば十分であることが示された。これは Rps20 をユビキチン化できる最小領域、61-539 領域よりも小さいため、NGD において Hel2 は Rps20 とは異なる未知の基質をユビキチン化することで、mRNA 分子内切断を惹起すると考えられる。今回の解析では Hel2 の新規ユビキチン化基質を明らかにすることはできなかった。しかし、Hel2 61-315 領域のみであっても、ユビキチン化されるタンパク質はバックグラウンドレベルで検出されており、これらの中に、NGD に必須な基質が存在する可能性も十分考えられる。また、RING-finger ドメインを持つ E3 ユビキチンリガーゼは一般に自己ユビキチン化を行うことが明らかにされていることから、自己ユビキチン化による活性化も可能性として考えられる。

Hel2 による何らかの因子のユビキチン化が mRNA 分子内切断を惹起するモデルの場合、エンドヌクレアーゼはユビキチン化された基質を認識してリクルートされると考えられる。エンドヌクレアーゼ自身がユビキチン結合ドメインを持つ場合、もしくはエン

ドヌクレアーゼがユビキチン結合タンパク質と結合し、リクルートされる場合が考えられる。いずれのモデルにおいても、ユビキチン化基質もしくは分子内切断に必須な新規因子の同定が必須であると考ええる。

3-4-3. NGD における、Hel2 と Asc1 の関係

今回、Asc1 の表現型の一部は Hel2 の機能阻害によって生じていることが示された。実際に *asc1* 欠損下では Hel2 のタンパク質発現量が低下しており、効率的なユビキチン化に支障をきたすと考ええる。Hel2 の発現量低下の原因は定かではないが、おそらく Asc1 がリボソーム上において、Hel2 の足場の一つとして機能し、効率的なユビキチン化に寄与しているためと考えられる。確かに、Asc1 と、Hel2 の基質として同定した Rps20 および Rps3 は 40S サブユニット上の非常に近い位置に存在しており、Asc1 の欠損がユビキチン化に影響を与えうる位置関係にある。実際に *asc1* 欠損下では Rps20 のユビキチン化効率が低下していた(図 3-7A)。しかし、なぜ Rps20 のユビキチン化が効率よく進行しない場合に、Hel2 の発現量が低下するかに関しては、解析が十分でないと考える。RING 型 E3 リガーゼの多くは自己ユビキチン化によって自身の分解を促すことが知られており、Hel2 も自己ユビキチン化を介して、自身の発現量を変化させている可能性も考えられる。MG132 等のプロテアソーム阻害剤を用いた解析により Hel2 の発現制御のメカニズムがより詳細に明らかにできると考えられる。

Asc1 は多機能タンパク質であり、RQC や NGD 以外にも様々なシグナルカスケード等に関与する。また、リボソーム上では翻訳開始因子の結合サイトになっており、eIF3 や eIF4B が近傍に結合する(Kouba et al., 2012; Walker et al., 2013)。翻訳伸長段階においては、リボソームのフレーム維持に関与することが報告されており、*asc1* 欠損下では CGA コドンクラスターにおけるフレームシフト効率が顕著に増加することが明らかにされている(Wolf and Grayhack, 2015)。したがって、*asc1* 欠損株の表現型はこれらすべての機能を欠損した条件での表現系であるため、注意する必要がある。今回の場合 Hel2

の過剰生産によって、*asc1* 欠損が相補されたため、少なくとも NGD における Asc1 の機能は Hel2 によって説明できると考えている。

3-4-4. 内在遺伝子の NGD による制御機構の意義

NGD は NMD や NSD と比較してメカニズムの解析やヒトの遺伝子疾患との関連解析がほとんど進んでいない。実際に内在性の遺伝子上で mRNA が NGD によって分解される例もあまり報告されておらず、ヒトにおいては *SERPING1* 遺伝子に変異が生じた場合に mRNA 構造が変化し、NGD を受ける可能性が示唆されているのみである (Colobran et al., 2014)。また、今回の解析においても、*hel2* 欠損下における翻訳停滞配列を含む mRNA の半減期を野生株と比較した場合、有意に半減期が伸びるものの、劇的な差とは言い難い。また、翻訳停滞配列を含む mRNA と含まない mRNA の半減期の差はほとんど見られなかった(図 3-2D)。さらに、Ski2 や Xrn1 の存在下では Hel2 非存在下での R(CGN)12 レポーター mRNA 量は野生株と比較してむしろ低下していた(図 2-11D)。これらの結果からも、NGD の生理学的意義がどの程度あるのかに関しては疑問が残る。その一方で、翻訳伸長停滞に起因するタンパク質分解機構 RQC はその生理学的意義が明らかになりつつあり、ヒト、マウスを始めとした哺乳類においても、その機構が保存されており、神経変性疾患との関連も示唆されている。RQC との関係を考えると、NGD によって mRNA の分解を促進することで、RQC 機構の負担を低減している可能性が考えられ、僅かな寄与ではあるが、この点において NGD が貢献しているのでは無いかと考えている。

第 4 章

終止コドンを持たない mRNA の品質管理機構解析

第 4 章 終止コドンを持たない mRNA の品質管理機構解析

4-1. 序論

本章では終止コドンもポリ A 鎖も持たないランケート mRNA の品質管理機構の解析結果を記載する。通常のノンストップ mRNA のみならずランケート mRNA も、Nonstop mRNA decay (NSD)機構によって分解される(図 1-5)。本研究では、ポリ A 配列依存的な翻訳伸長停滞に重要なリボソーム 40S サブユニットタンパク質 Asc1/RACK1 が、ポリ A 鎖を持たないランケート mRNA の分解に重要な役割を担うことを明らかにした。また、ランケート mRNA の 3'末端で停滞したリボソームに起因する mRNA 分子内切断機構 Dead-end NGD に Asc1 が必須であることを明らかにした。

本序論ではまず、Asc1/RACK1 のこれまで明らかにされている機能に関して記載する。また、Dom34-Hbs1 のヒトオルソログである Pelota-Hbs1L が出芽酵母においても同様に機能することも合わせて明らかにしたため、その研究背景について本項に記載する。

4-1-1. RACK1 (Receptor for activated C kinase 1)

RACK1 は真核生物において高度に保存されており、今回解析に用いた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では Asc1 がオルソログとしてゲノムにコードされている。また分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* における RACK1 オルソログは Cpc2 と呼ばれている。以下、遺伝子の表記等の特別な場合を除き、出芽酵母 RACK1(Asc1)を単に RACK1 と記載する。

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1)はトリプトファン-アスパラギン酸(WD)リピートタンパク質であり、N 末端に GH、C 末端に WD のアミノ酸配列を持つ WD40 ドメインを 7 つ持ち、 β プロペラ構造を形成している。これは X 線結晶構造解析や極低温電子顕微鏡を用いた構造解析の結果から明らかになった(Coyle et al., 2009; Sengupta et al., 2004)。

WD リピータンパク質はヒトにおいて 100 種以上のタンパク質が属す巨大ファミリーである。主な特徴は、7 個前後の WD40 リピートによって構成される β プロペラ構造を介して、様々な因子と結合する能力を保持し、細胞内シグナル伝達やタンパク質プロセシングの足場(スキャフォールド)タンパク質として機能する点である。近年の報告では、細胞内の主要なタンパク質翻訳後修飾の一つである、ユビキチンが非共有結合的に相互作用することが明らかにされた(Pashkova et al., 2010)。WD40 ドメインは G タンパク質 β サブユニットおよび CDC4 の構造解析から初めて明らかとなり(Fong et al., 1986)、RACK1 も同様に G β 様の構造をとる。

RACK1 はタンパク質リン酸化酵素の 1 つである PKC(Protein Kinase C : C Kinase)の結合タンパク質として機能同定され、活性化した PKC と結合し、基質へと導くことが報告されている(Ceci et al., 2003)。また細胞の成長と接着に関与する Src キナーゼと相互作用するが、Src に対してはキナーゼ活性を抑制することが明らかとなっている(Chang et al., 2002; Chen et al., 2008)。

RACK1 の機能は多岐にわたる。ストレス応答性アポトーシス、減数分裂に必須である(Arimoto et al., 2008; McLeod et al., 2000)。翻訳抑制や翻訳促進、腫瘍細胞増殖に関与する報告は多数存在する。また近年ヒトと線虫の miRNA サイレンシングに関与すること、植物シロイヌナズナにおける miRNA の細胞内存在量制御に関与することが報告され、小分子 RNA を介した遺伝子発現制御にも深く関わっていることが示唆されている(Jannot et al., 2011; Speth et al., 2013)。また、肝細胞がんにおいて RACK1 の存在量が低下することで Dicer ファミリータンパク質の KSRP が RACK1 と結合できず、結果として miRNA の生合成経路が活性化されずに miRNA の発現量が低下することが報告されている(Otsuka et al., 2011; Speth and Laubinger, 2014)。なお、本研究室では、連続した塩基性アミノ酸配列に起因する翻訳アレストに重要な因子として、リボソーム 40S サブユニットに結合した RACK1 の機能解析を行なった(Kuroha et al., 2010)。

4-1-2. RACK1 とリボソーム

RACK1 はリボソームタンパク質のひとつとして数えられている。酵母およびヒトのリボソーム質量分析の結果から RACK1 がリボソームの小サブユニットである 40S サブユニットと 1:1 の比率で結合することが報告されている(Gerbasi et al., 2004; Link et al., 1999)。極低温電子顕微鏡構造からも RACK1 がリボソーム 40S サブユニットに結合することが明らかにされ、詳細な結合位置および相互作用残基が決定された(Sengupta et al., 2004)。RACK1 は 40S サブユニットのヘッド領域、mRNA トンネルの出口付近に結合し、18S リボソーム RNA(rRNA)のヘリックス 39 およびヘリックス 40、リボソームタンパク質の Rps3, Rps16, Rps17 と相互作用する(Adams et al., 2011; Rabl et al., 2011)。RACK1 は足場タンパク質として様々なシグナル伝達、細胞内反応に関与することから、まだ明らかにされていない因子が RACK1 を介してリボソームに結合し、リボソーム上で mRNA の翻訳制御や分解制御に関与している可能性が考えられる。例えば RNA 結合タンパク質である Scp160 は自身の mRNA 結合特異性を介して、ある種の、例えば酵母のメイティングに関与する mRNA のみをリボソーム上へリクルートするが、この時 Scp160 の KH ドメインを介して Asc1 と結合し、リボソームと相互作用することが知られている(Li et al., 2004; Sezen et al., 2009)。

真核生物の RACK1 はリボソーム 40S サブユニットとの結合能が保存されているが、ミトコンドリアや原生生物のリボソームには RACK1 は存在しない。また真核生物において RACK1 はほぼすべてのリボソームに結合することが分かっているが、RACK1 が結合していないリボソームもわずかに存在することが報告されている(Baum et al., 2004)。また、出芽酵母ではリボソームに結合していない RACK1 の量は相対的に少ないのに対し、哺乳類では多くの遊離 RACK1 が存在し、シグナル伝達の足場として機能している。

4-1-3. RACK1 と翻訳

哺乳類において、リボソーム上に存在する RACK1 と相互作用する因子として初めて同定されたのは、活性化 PKC であった。活性化 PKC は翻訳開始因子(eIF)の 1 つである eIF6 のリン酸化を行なう(Ceci et al., 2003)。eIF6 は脱リン酸化状態では 60S サブユニットの 40S サブユニットとの会合面に結合しており、40S サブユニットと会合できないように制御している。翻訳開始反応時には、eIF6 が PKC によるリン酸化を受けることで 60S から解離し、40S が 60S と会合できるようになることで、80S が形成され、翻訳が開始される(Ceci et al., 2003)。これは eIF6 が過剰発現した条件下でのみ観測される現象であり、通常条件下では eIF6 以外にもリボソーム-RACK1-PKC によるリン酸化を受ける因子が存在する可能性が考えられている。翻訳開始因子 eIF4E も *in vitro* においてリン酸化による制御を受けることが分かっている。また *in vitro* でリン酸化されるセリン残基が *in vivo* でもリン酸化されること、キャップに結合する eIF4E と RACK1 上の PKC の位置が非常に近いことから、*in vivo* において eIF4E は RACK1 を介して PKC によるリン酸化を受けている可能性が考えられている。

細胞のストレス応答においても RACK1 がその制御に関わっていることが報告されている。培養細胞においてストレスは 2 種類に大別され、1 型ストレス(低酸素状態、ヒートショック、亜硫酸、等)下では細胞質にストレス顆粒(Stress Granules : SGs)と呼ばれる凝集体を形成する。SGs には翻訳開始因子が局在し、翻訳開始が一時的に停止することでストレス時に誤って折りたたまれたタンパク質(misfolded proteins)が蓄積することを防いでいる。SGs の形成には RNA 結合タンパク質 TIA-1 と TIAR、Ras-GAP SH3 ドメイン結合タンパク質 G3BP、ストレス応答によりリン酸化された eIF2 α が必要である(Anderson and Kedersha, 2006; Kedersha et al., 2002; Tourrière et al., 2003)。eIF2 α のリン酸化は翻訳開始時三者複合体である eIF2-GTP-Met tRNAⁱ の形成を防ぐ。RACK1 はストレス性アポトーシスシグナル伝達経路である SAPK 経路の上流において MTK1(MAPKKK)と結合することで MEK1 の二量体化と自己リン酸化に関わっている

が、1 型ストレス下では RACK1 はリボソーム 40S と共に SGs に局在するため MTK1 と結合できずアポトーシスを誘導することができない。一方、2 型ストレス(X 線、エトポシド、MMS 等の遺伝子に障害を与える因子)を受けた時には SGs は形成されず、RACK1 は MTK1 と結合する。そして MTK1-SAPK シグナル経路を介して細胞をアポトーシスへと誘導する。1 型ストレスと 2 型ストレスが同時に存在する場合は SGs 内に RACK1 が局在しアポトーシスは抑制される(Arimoto et al., 2008)。

4-1-4. RACK1 の構造

RACK1 の特徴については前述の 4-1-1 項でも示したが、RACK1 は $G\beta$ と似た王冠状構造をとっている。WD40 ドメイン 1 つでブレードを形成しているが、このブレード同士を結んでいるループ構造のうち、ブレード 3 と 4 の間(loop)とブレード 6 と 7 の間(knob)は、大きなループを形成している(Taylor et al., 2009)。このループ構造は $G\beta$ には存在しない。

RACK1 は 18S rRNA の h39-h40 およびリボソームタンパク質 Rps3、Rps16、Rps17 と直接結合することが構造解析から明らかにされている。この内、18S rRNA との会合面に位置する RACK1 の塩基性アミノ酸残基(R38, K40, K62, K87, R90, R102)を置換した変異体を用いて、リボソームとの結合解析を行なった結果、最も結合能が低い変異体として塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換した R38D K40E が同定された。この RACK1 R38D K40E 変異体は DE mutant と呼称され、現在最も汎用されている RACK1 変異体である。また当研究室で以前行なった、PCR を用いた突然変異誘発によって DE mutant よりリボソーム結合能が低い D109Y 変異体を同定した(Kuroha et al., 2010)。D109 はヒト RACK1(D108)に保存されており、出芽酵母では Rps17 R33 と相互作用する残基である(Ikeuchi and Inada, 2016)。近年、ショウジョウバエおよびヒト RACK1 がリボソームに結合していることが、DCV (*Drosophila C virus*)や CrPV (Cricket Paralysis Virus)の IRES (Internal Ribosome Entry Site)依存的な翻訳に必須であることが報告されており、解析に

はリボソームとの結合能が低下する RACK1 変異体として、R36D K38D 変異体および D108Y 変異体が使用されている(Majzoub et al., 2014)。また、リボソームに結合している Asc1/RACK1 がグローバルな翻訳に与える影響に関して解析した先行研究では、出芽酵母 Asc1 D109Y 変異体および Asc1 M1X null 変異体を使用してリボソームプロファイリングを行っており、Asc1 がリボソームに結合していることで、短い ORF を持つ mRNA の翻訳を促進する可能性が示唆されている(Thompson et al., 2016)。

4-1-5. miRNA によるサイレンシングと RACK1

線虫とヒトにおいて miRNA によるサイレンシング機構を介した翻訳抑制に RACK1 が関与していることが報告された。miRNA は線虫以上の高等真核生物においてゲノム中にコードされる小分子 RNA で、ターゲット mRNA の相補配列に結合して遺伝子発現を抑制する。miRNA は Argonaut タンパク質 Ago2 を介して、miRNA サイレンシングの本体である TNRC6/GW182 と miRNA サイレンシング複合体(miRISC)を形成し、標的 mRNA の翻訳抑制と分解を促進する。RACK1 は Ago2 と結合し *let-7* および *lin-4* の標的 mRNA のサイレンシングに関与することが明らかにされ、リボソームに結合した RACK1 が *let-7* および *lin-4* の標的 mRNA へのターゲティングを促進するモデルが提唱された(Gandin et al., 2013; Jannot et al., 2011)。

またシロイヌナズナを用いた研究では、RACK1 が細胞内に存在する miRNA 量の制御に関わることが報告された(Speth et al., 2013)。また、肝細胞がんでは細胞内の miRNA 量が減少し、遺伝子発現制御機構が破綻することが知られているが、その主要な原因の一つが RACK1 タンパク質の減少であることが明らかにされた(Otsuka et al., 2011)。これは、RACK1 が miRNA プロセシング酵素 Dicer ファミリーの一分子である KH 型スプライシング制御タンパク質(KSRP)と結合し、miRNA の成熟過程制御に関わっているためと考えられている。

4-1-6. Dom34/Pelota-Hbs1 の機能

Dom34:Hbs1 複合体は NGD に関与する因子として提唱され、その後 NSD において終止コドンを持たない mRNA の 3'末端に停滞したリボソームのサブユニット解離反応に必要であることが *in vitro* 研究で明らかにされた。当研究室ではこの複合体が、*in vivo* においてノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームのサブユニット解離に寄与していることを証明した(Tsuboi et al., 2012)。

また *dom34Δ*株では、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームがサブユニット解離されずに停滞するため、後続のリボソームが停滞したリボソームによる翻訳伸長阻害を引き起こしさらに停滞する。これによって NGD が惹起され、mRNA 分子内切断が生じることが示唆された (図 4-1)。*dom34Δ*株では mRNA の断片化が観察され、さらにその断片はリボソームが覆う mRNA の長さに近い 25-30nt 毎に生じていることから推察された。この 3'末端で停滞したリボソームに起因する mRNA の断片化(Dead-end ribosome induced sequential mRNA cleavage; Dead-end NGD)は、*ski2Δdom34Δ*株において NGD の 5'中間産物が減少する原因の一つとして考えられる。Dom34 は NGD の mRNA 分子内切断には直接的に関与せず、切断によって産生された 5' NGD 中間産物(トランケート mRNA)上で停滞したリボソームのサブユニット解離に関与しており、*ski2Δdom34Δ*株においてはリボソームが解離せず、Dead-end NGD が惹起されるため、見かけ上 5'NGD 中間産物が減少していたと考えられる(図 3-12B)。

4-1-7. ヒトにおけるリボソーム解離因子 Pelota-Hbs1L-ABCE1

出芽酵母において Dom34-Hbs1 は遺伝子欠損株の作製が可能な非必須遺伝子であるが、リボソームのサブユニット解離を行なう活性本体の Rli1 は必須遺伝子であるため、*in vivo* における解析が出芽酵母においても困難である。また Rli1 は、N 末端の FeS クラスタードメインと Mid~C 末端の 2つの ATPase ドメインを保持する多機能タンパク質であり、前者はストレス応答および Pelota との結合、後者はリボソームサブユニット解

離に関わる(Barthelme and Sauer, 2012; Pisarev et al., 2007, 2010; Pisareva et al., 2011)。出芽酵母 Dom34:Hbs1 および Rli1 はいずれもヒトにおいて保存されており、それぞれ Pelota、Hbs1L、ABCE1 と呼称される。しかしヒト細胞を用いた *in vivo* におけるリボソームサブユニット解離反応の解析手法は確立されておらず研究は進んでいない。先行研究から、出芽酵母(sc)Dom34 と hHbs1L および hPelota と Hbs1 は互いに相互作用しないことが明らかにされている。本項では出芽酵母のリボソーム解離評価系にヒト Pelota、Hbs1L、ABCE1 を導入することで、その機能保存性を評価した(Ikeuchi et al., 2016)。

4-2. 目的

本章では、終止コドンもポリ A 鎖も持たないトランケート mRNA の分解機構における、詳細な分子機構の解明と理解を目的とした。特にリボソーム 40S サブユニットタンパク質 Asc1/RACK1 の機能解析および、Dom34 のヒトオルソログである Pelota の機能保存性解析を行うことで、それぞれのトランケート mRNA の分解機構における役割・機能の理解を目指した。

4-3. 結果

4-3-1. *dom34Δ*株において生じる Dead-End リボソームによって引き起こされる mRNA 断片化(Dead-End NGD)に Asc1/RACK1 が必須である

トランケート mRNA の分解機構における Asc1/RACK1 の機能を明らかにするため、研究を行なった。本研究にはレポーター mRNA を使用した(図 4-2 A 上)。GFP と HIS3 の間に RNA 自己切断活性をもつハンマーヘッドリボザイム配列(Rz)を挿入し、Rz 配列内での自己内部切断を誘発することで、*in vivo* で効率的にトランケート mRNA を産生する。このレポーターによって産生されるトランケート mRNA は、GFP の 3'末端側に Rz 配列の残りが 6 塩基(CCUGUC)付加され、末端のコドンがバリンとなる。リボソームが末端で停滞する際に、リボソームに含まれるペプチジル tRNA はバリンと tRNA がエステル結合した状態となる。アミノ酸と tRNA の結合では、アミノ酸残基のカルボニル基と tRNA 3'末端アデニン(A76)の 2'水酸基または 3'水酸基がエステル結合しており、アミノ酸残基側の側鎖がエステル結合の安定性、反応性に影響を与える。通常、アミノ酸残基と tRNA のエステル結合は反応性が高く、塩基性条件下ではリボソームの PTC 活性無しでも加水分解反応が進行し、中性条件下においても、アミノ酸残基側の側鎖によっては反応性が高く近位に水分子が存在するのみで加水分解する。しかし、バリン tRNA のエステル結合は比較的安定であり、中性条件下では解離せずに保持されるため、ペプチジル tRNA を検出することでリボソームが末端で停滞していることを評価

できる。

また、*GFP-Rz* mRNA はトランケート mRNA のため、ポリ A 鎖を保持していない。すなわち、PABP および Cap 結合タンパク質を介した結合(ポリ A 鎖-PABP-eIF4G-eIF4E-cap)による closed-loop 構造が形成できず、一本鎖 mRNA の状態で存在し、デキャッピングを介した Xrn1 エキソヌクレアーゼによる分解の標的となる。しかし、出芽酵母においては野生株定常状態においても、ノーザンブロット法によりある程度検出可能であるため、トランケート mRNA の分解機構解析に使用した。なお exosome の活性を阻害する条件である *SKI2* 欠損下では、トランケート mRNA は安定に存在する。

まず、トランケート mRNA 分解機構における Asc1/RACK1 の機能を解析するため、各出芽酵母欠損株における定常状態の *GFP-Rz* mRNA の発現量をノーザンブロット法により比較した。なお解析には GFP の 3'末端に相補する DIG ラベルプローブ(*GFP G3*)を使用した(図 4-2)。その結果、これまでの解析どおり、*dom34* 欠損株において、*GFP-Rz* mRNA よりも短い RNA 断片(fragments)が観察された(図 4-2 A 下)。これらは *dom34* 欠損株においては *GFP-Rz* mRNA の 3'末端で停滞したリボソームが解離できず、Dead-end NGD によって切断された産物である(Tsuboi et al., 2012)。通常 mRNA の切断片はエキソヌクレアーゼにより迅速に分解されるが、Dead-end NGD によって産生された断片はリボソームによってマスクされているため、エキソヌクレアーゼ存在下においても半減期が長く、検出可能である。一方で、*dom34* 欠損下においても、*asc1* 欠損下では Dead-end NGD 由来の RNA 断片が全く検出されなかった。Dead-end NGD 由来の RNA 断片をより高解像度に観察するため、TBE-urea PAGE により泳動分離後にノーザンブロットを行ったが、*dom34* 欠損下にもかかわらず、*asc1* 欠損下では断片が産生されなかった(図 4-2B)。以上の結果から、1) Asc1 は *dom34* 欠損下におけるリボソームの停滞に影響している、もしくは 2) Dead-end NGD において、mRNA 分子内切断に必須である可能性が示唆された。

1)および2)の可能性を検証するため、*GFP-Rz* mRNA の半減期を測定した。ガラクトース誘導性の *GAL1* プロモーター下流に *GFP-Rz* ORF を繋いだレポーターを導入した出芽酵母を使用した。出芽酵母をグルコース非存在下かつガラクトース存在下で対数増殖期まで培養した後、グルコース含有培地に培地交換することで *GFP-Rz* mRNA の転写をオフにし、経時的にサンプリングした。RNA サンプルをノーザンブロット法により解析、定量し半減期を算出した(図 4-2 C)。その結果、Xrn1 による 5'側からの分解が起こるものの、3'側からの分解は停滞したリボソームによって抑制されている、*dom34Δ*株での半減期が 4.1 ± 0.3 分であったのに対して、*asc1Δdom34Δ*株では半減期は 7.0 ± 1.2 分であった。Xrn1 による 5'側からの分解のみ起こる条件である、*ski2Δdom34Δ*株での半減期が 5.0 ± 0.7 分であったのに対して、*asc1Δski2Δdom34Δ*株では半減期が顕著に長くなった(32 分超)。これらの結果から、3'側からの分解が生じない条件下において、Asc1 が mRNA 分解に極めて重要であることが明らかにされた。また、*asc1* 欠損下では分子内切断による断片化が生じないことから、mRNA 分解が抑制された可能性、すなわち 2)の可能性が考えられる。一方で、5'側からの分解も 3'側からの分解も起こらない、*xrn1Δdom34Δ*株での半減期が 27.6 ± 3.2 分であったのに対して、*xrn1Δdom34Δasc1Δ*株では 18.5 ± 3.5 分であった。*asc1* 欠損下では分子内切断による断片化が生じないことから、*asc1* 欠損下における半減期の短期化は分子内切断以外の可能性が考えられる。Asc1 は CGA クラスター配列やポリ A 配列等の翻訳伸長停滞配列における翻訳停滞に重要であり、*asc1* 欠損下では CGA クラスター配列におけるフレームシフトが頻発することが報告されている。このような観点から、*asc1* 欠損下ではリボソームの停滞能が弱く、3'末端で停滞したリボソームがある頻度で mRNA から解離し、exosome による分解を受けている可能性、すなわち 1)の可能性が考えられる。しかし、*xrn1Δdom34Δasc1Δ*株での半減期は *xrn1Δ*株等と比較しても 18.5 分と長いことから、*asc1* 欠損下でリボソームが停滞しなくなるわけではなく、低頻度で mRNA から解離している可能性が考えられる。実際に、後述の解析において、*ski2Δdom34Δasc1Δ*株においてもペプチジル tRNA が検出

されているため、リボソームの停滞は生じていると考えられる(図 4-5 A-B)。

4-3-2. *dom34* 欠損下において断片化した mRNA は停滞したリボソームと共精製される。

Dead-end NGD において、生じる mRNA の断片化がおよそリボソーム 1 つ分毎に生じていることから、これらの断片化が末端で停滞した複数のリボソームによって惹起されることが考えられる。しかし、実際に停滞したリボソーム依存的に断片化が生じるかに関しては直接的な証拠はこれまで得られていなかった。確かに、Xrn1 および exosome が存在する条件においても、mRNA 断片は検出できることから、停滞したリボソームが mRNA 断片をマスクしている可能性が示唆されていた。以上の背景から、停滞したリボソーム依存的に mRNA の断片化が生じる場合、観察される mRNA 断片は停滞したリボソームによって保護されていると考え、停滞したリボソームの精製を行ない、共精製される mRNA 断片を TBE-Urea PAGE を用いたノーザンブロット法により解析した。

停滞したリボソームを精製するため、N 末に Protein A およびタバコモザイクウイルス由来プロテアーゼ切断サイト (TEV site) を付加した GFP-Rz レポーター (*ProteinA-TEV-GFP-Rz*) を使用し、IgG-Protein A のアフィニティにより新生鎖を精製することで、停滞したリボソームを新生鎖ごと精製した (Ikeuchi and Inada, 2016; Matsuo et al., 2014)。TEV プロテアーゼによって精製ビーズから切り離した後、mRNA 上に存在するリボソーム-新生鎖複合体、すなわち停滞したリボソームのみを精製するため、FLAG タグを付加したリボソーム 40S サブユニットタンパク質 Rps2 を発現させておくことで、2 段階目に FLAG 抗体を用いてリボソームの精製を行なった。精製画分を PAGE および CBB 染色で確認し、当量のリボソームが精製できていることを確認した (図 4-3 A)。また中性ゲル電気泳動後のウェスタンブロッティングにより、ペプチジル tRNA の状態の新生鎖 (GFP-Rz-tRNA) を検出し、*GFP-Rz* mRNA の末端で停滞したリボソームを精製したことを確認した (図 4-3 B)。精製画分から RNA を抽出し、TBE-urea PAGE を用いたノ

ーザンブロット法により mRNA 断片の検出を行なった(図 4-3 C)。その結果、*dom34Δ*株において停滞したリボソームと共に mRNA 断片が共精製されることが明らかになった。一方で *dom34Δasc1Δ* 二重欠損株においては、同様の断片は共精製されなかった。以上の結果から mRNA の断片化は停滞したリボソームによって惹起され、mRNA 断片は停滞したリボソームによってマスクされていることが明らかにされた。また、Asc1 が停滞したリボソームに起因する mRNA 断片化に重要であることも強く示唆された。

4-3-3. Asc1/RACK1 がリボソーム 40S サブユニットに結合することが Dead-end NGD に必須である

Asc1 はリボソーム 40S サブユニットタンパク質の Rps3、Rps16、Rps17 および 18S rRNA h39-h40 を介してリボソームに結合するリボソームタンパク質である。これまでの解析において、Asc1 が停滞したリボソームに起因する mRNA 分解系 Dead-end NGD に必須であることを明らかにしてきたが、リボソーム上に結合している Asc1 が必須なのか、遊離 Asc1 が必須なのかに関しては明らかにしていなかった。そこで、リボソームとの結合能が低下する新規変異体を作製し、Dead-end NGD にリボソーム結合型 Asc1 が必須か否か検証した(図 4-4 A)。

まず、Asc1 のリボソームとの会合面に相当する残基をトリプルアラニン置換した変異体を作製し、既に Asc1 のリボソームとの結合が必須であることが明らかにされている、R(CG N)12 配列における翻訳停滞に関して解析を行なった(図 4-4 C)。その結果、16HNG18、38RDK40、85WDK87 の各アミノ酸残基をトリプルアラニン置換した変異株では、R(CG N)12 配列の翻訳効率が上昇した。これらの変異体に関して、ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析により、リボソーム画分に存在するか否かを確認したところ、16HNG18 はまだ 80S を中心にリボソームと結合していたが、38RDK40、85WDK87 の両変異体は顕著にリボソーム結合能が低下していた(図 4-4 B)。しかし、依然として少量の Asc1 変異体はポリソーム画分に存在していることから。これらの変異

体は完全にリボソームとの結合能が無くなったわけではないと考えられる(Thompson et al., 2016)。リボソームとの結合能が低下した変異体の変異導入残基をマップしたところ、その多くは 18S rRNA の h39-h40 領域と相互作用しうる位置に存在していた。また、構造学的観点から、当研究室で以前作製した D109Y 変異体は、D109 残基を介した Rps17 R33 との相互作用に欠損を示すため、リボソームとの結合能が顕著に低下したと考えられる(図 4-4 A)。

新規に作製した 3 つの Asc1 変異体および D109Y 変異体を導入した株を作製し、Dead-end NGD 産物である mRNA 断片が生じうるか解析したところ、各変異体発現株における mRNA 断片量は、Asc1 野生株と比較して顕著に低下していた。以上の結果から、Dead-end NGD における mRNA 断片化には、Asc1 がリボソームに結合していることが重要であることが強く示唆された。

4-3-4. *ski2Δdom34Δrack1Δ*株はペプチジル tRNA および GFP-Rz タンパク質が顕著に増加する

ここまでの解析結果から、Asc1/RACK1 が Dead-End NGD の mRNA 断片化に必須であることが明らかになった。一方で *asc1* 欠損下では mRNA の断片化が生じないことで、より多くのリボソームが mRNA 上で停滞する可能性が考えられる。そこで、p416GAL1p-GFP-Rz を用いて *ski2Δdom34Δ*、*ski2Δdom34Δasc1Δ*各株を形質転換し、得られた酵母株のライセートを調製後、ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析を行ない、ペプチジル tRNA および mRNA の分布を中性ゲル電気泳動を組み合わせたウェスタンブロット法とアガロースゲル電気泳動後のノーザンブロット法により解析した。その結果 *ski2Δdom34Δ*、*ski2Δdom34Δasc1Δ*各株間でペプチジル tRNA および mRNA の分布に変化は見られなかったものの、依然としてモノソームのみならずポリソーム画分にも停滞したリボソームが存在していた(図 4-5A)。しかし一方で、*ski2Δdom34Δasc1Δ*株ではリボソームフリーの領域の GFP-Rz タンパク質量が顕著に増加していた。また、

ski2Δdom34Δ、*ski2Δdom34Δasc1Δ* 各株のライセートに関して、分画前の総タンパク質量を定量したところ *ski2Δdom34Δasc1Δ* 株ではフリーの GFP-Rz に加えてペプチジル tRNA 量が顕著に増加していた(図 4-5 B)。以上の結果および図 4-2C の GFP-Rz mRNA 半減期測定の結果から、以下のモデルが考えられる。Dom34 および Asc1 非存在下ではノンストップまたはトランケート mRNA 上にリボソームが停滞しペプチジル tRNA が蓄積する。停滞したリボソームがある頻度で mRNA から脱落し、遊離したリボソームに含まれるペプチジル tRNA からペプチド鎖が分解を受けずに解離し蓄積する。このため、リボソームおよび tRNA のリサイクリングに支障をきたしているのではないかと推測できる。実際、本実験を行う過程で、p416GPDp-GFP-Rz を用いて *ski2Δdom34Δrack1Δ* 株を形質転換した際、細胞増殖の顕著な阻害が確認された(図 4-5 C)。実際に p416GPDp-GFP-Rz を保持する *ski2Δdom34Δasc1Δ* 株は、30℃, SC+Galactose-Ura プレート上でのコロニー形成に 7 日を要した。NGD も NSD も受けない p416GPDp-GFP-FLAG-HIS3 を用いて形質転換した際は細胞増殖には影響を与えず、GFP-FLAG-HIS3 および GFP-Rz の転写誘導を行わない条件では、細胞増殖能にレポーター間の差は観察されなかった。以上の結果から、*ski2Δdom34Δasc1Δ* 株ではノンストップ mRNA によって細胞増殖が阻害される可能性が考えられ、その原因の一つに、GFP-Rz mRNA 上で停滞したリボソームが解消されず、リボソームおよび tRNA のリサイクリングに支障をきたしていることが可能性として考えられる。

細胞からノンストップ mRNA を排除することは、本来非常に重要であり、その破綻は細胞の恒常性に影響を及ぼすことが明らかにされた。また、ノンストップ mRNA の排除には Asc1/RACK1, Dom34/Pelota, Exosome の活性が必須であることが明らかになった。実際に哺乳類の *in vivo* においても停滞したリボソームの解消が重要で在ることが明らかにされている。マウスの中枢神経細胞において特異的に発現する tRNA^{Arg} 遺伝子が欠損したマウスでは AGA アルギニンコドンで翻訳停滞を引き起こすことが示唆されており、このマウスに、停滞したリボソームの解消に必須な Hbs1 オルソログとして機

能同定された GTPBP2 の遺伝子変異が生じた場合、停滞したリボソームが解消されないため、神経細胞死が生じることが報告されている(Ishimura et al., 2014)。

4-3-5. Dom34 および Asc1 はノンストップ mRNA 由来産物の RQC による分解には不要である。

Dom34 は 3'末端で停滞したリボソームの解離に必須な因子であり、トランケート mRNA を含むノンストップ mRNA の分解系 NSD に必須であることが明らかにされている。リボソームのサブユニット解離に必須であることから、サブユニット解離を伴う異常新生鎖分解機構 RQC の惹起にも Dom34 は必須であると考えられてきた。RQC 機構において 60S サブユニット上に形成される RQC 複合体上で、E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 が新生鎖をユビキチン化することでプロテアソーム依存的な分解を誘導することが明らかにされている(Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman et al., 2012; Matsuda et al., 2014)。そこで、*dom34* 欠損株において、*ltn1* 欠損時にノンストップ産物が蓄積するか否かを確認した。その結果、*dom34* 非存在下においても、依然として *ltn1* 欠損時にノンストップ産物が蓄積し、RQC が生じていた(図 4-6 A)。また、*dom34asc1* 二重欠損株を用いて、Ltn1 依存的な分解が生じるかを確認したが、依然として Ltn1 依存的な RQC は生じていた。これらの結果はノンストップ mRNA の安定化に寄与する Ski2 のヘリカーゼ活性を持たないドミナントネガティブ変異体 Ski2 E445Q を過剰発現した場合でも同様であった(図 4-6 A-B)。以上の結果から、ノンストップ mRNA 由来産物の分解機構 RQC は Dom34 および Asc1 非依存的に生じ、Dom34 によるリボソームのサブユニット解離能は不要であることが明らかにされた。

4-3-6. ヒト Pelota-Hbs1L および hABCE1 の、リボソーム解離能の解析

Dom34-Hbs1 は出芽酵母からヒトに至るまで保存されており、ヒトオルソログである

Pelota-Hbs1L がヒト培養細胞において、ノンストップ mRNA の分解に関与することが明らかにされている。しかし、培養細胞系を用いた実験ではリボソームの解離活性に関して評価する系が存在せず、出芽酵母および試験管内実験系における機能解析の結果のみで考察せざるをえない。しかし、実際に Pelota がリボソームを解離するか否かに関して確認することは分子メカニズムを理解する上で必要であることから、本研究では出芽酵母内でヒト Pelota および hHbs1L を発現させることで、酵母細胞内において、Pelota-Hbs1L がリボソームのサブユニット解離に寄与するか解析を行なった。

解析には出芽酵母 *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* 株を使用した。通常 Dom34 非存在下では *GFP-Rz* mRNA の末端で停滞したリボソームのサブユニット解離が行われず 3' 側からの mRNA 分解が阻害される。また、*Xrn1* 欠損下では 5' 側からの分解が行われないため、mRNA の半減期は顕著に長期化する(32 分超、図 4-7 A)。出芽酵母 *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* 株に Dom34 を導入した場合には、*GFP-Rz* mRNA の半減期が 10.2 ± 1.6 分と顕著に短くなった。一方 Hbs1 のみの発現下では非発現下と比較して半減期に変化が見られなかった(32 分超)。Dom34-Hbs1 を共発現した場合は Dom34 のみと比較して半減期が短期化し、 4.9 ± 1.9 分であった。これは *xrn1* 欠損株とほぼ同等であることから、Dom34-Hbs1 は共発現することで *DOM34* および *HBS1* の二重欠損を相補できることが確認できた。また出芽酵母 *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* 株にヒトオルソログ Pelota-Hbs1L を発現させることで、リボソーム解離能を評価できる実験系として使用できることが確認できた。

出芽酵母 *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* 株にヒト Pelota を導入したところ、*GFP-Rz* mRNA の半減期が 8.8 ± 3.4 分と顕著に短くなった(図 4-7 B)。ヒト Pelota およびヒト Hbs1L を共発現した場合は Pelota のみと比較して有意差は見られなかった(半減期 11.5 ± 0.6 分)。またヒト ABCE1 をさらに発現させた場合にも顕著な差は観察されなかった(半減期 8.8 ± 5.1 分)。Hbs1L および ABCE1 に関して表現型が観察されなかったことから、実際にヒトリボソーム解離因子が酵母細胞内において発現するか否か、ウェスタンブロッティングにより確認したが、発現量自体は確保されていた(図 4-7 C)。以上の結果から、ヒト

Pelota は出芽酵母内においても NSD に寄与し、恐らく、リボソームのサブユニット解離を促進していると考えられる。一方で Hbs1L および ABCE1 は出芽酵母内においては必ずしも必要では無かった。*Pelota* や Dom34 はリボソームの解離を促進するものの、リボソームの解離因子本体ではないため、本実験系では恐らく出芽酵母内の Rli1 が *Pelota* 依存的なリボソームの解離に関与していると考えられる。本実験系構築にあたり、出芽酵母必須遺伝子の Rli1 を ABCE1 が相補しうるか解析した。しかし ABCE1 の発現は *rli1* 欠損を相補することはできなかった(data not shown)。Rli1 および ABCE1 は通常の翻訳終結においてもリボソームのサブユニット解離に必須であることから、出芽酵母 Dom34 および eRF1 と相互作用できない可能性が高い ABCE1 では *rli1* 欠損を相補できなかったと考えられる。

次に、*Pelota* は出芽酵母内において停滞したリボソームのサブユニット解離を促進すると考え、*Pelota* 発現株における GFP-Rz ペプチジル tRNA の検出を行なった。その結果、野生型の *Pelota* 発現株では GFP-Rz ペプチジル tRNA は検出されなかった(図 4-8 A)。一方で構造学的観点から *Pelota* の機能に必要な残基のアラニン置換変異体(K2A、R45A) および欠失変異体($\Delta(45-60)$)を発現させた株においては(図 4-8 A)、GFP-Rz ペプチジル tRNA が観察されリボソームの解離が促進されないことが示された。以上の結果から、*Pelota* は出芽酵母内において、GFP-Rz mRNA の末端で停滞したリボソームのサブユニット解離に寄与することが明らかになった。

また、FLAG タグを付加した *Pelota* 野生型および R45A 変異体を発現させた株を用いて、*Pelota* の精製を行なったところ、リボソームが共精製されることを見いだした(図 4-8B)。精製サンプル中に含まれる GFP-Rz ペプチジル tRNA の検出を行なったところ、*Pelota* 野生型ではペプチジル tRNA は観察されなかったのに対して、R45A 変異体ではペプチジル tRNA が共精製された(図 4-8C)。以上の結果から、野生型の *Pelota* はペプチド鎖解離活性を有している可能性があり、R45A 変異体は、ペプチド鎖解離活性およびリボソームのサブユニット解離活性を保持していない可能性が示唆された。また、ショ

糖密度勾配遠心後、ポリソーム解析によって、Pelota 精製画分に含まれるリボソームの組成を確認した結果、野生型、R45A 変異型共に主に 80S リボソームが精製されることが明らかになった(図 4-8D)。また、R45A 変異型の方が野生型と比較して効率よく停滞した 80S リボソームを生成できることが明らかになった。以上の結果を総括すると、Pelota は出芽酵母内においても NSD に寄与し、リボソームのサブユニット解離およびペプチド鎖の tRNA からのリリースを促進することが示された。

4-4. 考察

4-4-1. Dead-end NGD における、Hel2 と RACK1 の関係

第3章では Hel2 が Dead-end NGD に重要な因子であることを明らかにし、本章では Hel2 と同じスクリーニングによって得られた Asc1 が同じく Dead-end NGD に必須で在ることを明らかにした。しかし *hel2* 欠損株においては少量の断片が検出されていたことから、Dead-end NGD においては Hel2 は重要であるが必須ではないように見られる(図 3-8B)。一方で通常の翻訳伸長停滞に起因する NGD においては Hel2 は必須である一方で、Asc1 は必須ではなく、*asc1* 欠損株においても少量の断片が検出されていた(図 3-6A)。NGD において、Asc1 は Hel2 によるユビキチン化を促進することで NGD に寄与しており、同一の分子機構内で NGD に寄与していることが示唆された。しかし、Dead-end NGD において、両者が同一の分子機構内で寄与するか否かに関しては、今回の解析のみでは十分に議論することはできなかった。今後分子機構を明らかにする上で、Asc1 と Hel2 の二重欠損株を用いた解析等が必要であると考ええる。また、Dead-end NGD に Hel2 のユビキチン化活性が必要か否かに関しても、同様に解析する必要があると考ええる。

4-4-2. Asc1/RACK1 とリボソームとの相互作用

今回用いた Asc1 変異体は、極低温電子顕微鏡による構造解析からリボソームとの会合面に位置する残基をアラニン置換した変異体であり、解析結果から、16HNG18AAA, 38RDK40AAA, 85WDK87AAA においてリボソームとの結合が低下し、翻訳アレスト効率が低下していることが明らかとなった。またこれらの変異体では Dead-end NGD においても mRNA 分子内切断効率が低下した。つまり RACK1 がリボソーム上に存在することが、mRNA 末端を含む翻訳伸長阻害に起因する mRNA 品質管理機構に重要であるということが予想される。

今回リボソームとの結合が低下した変異体残基のうち H16, R38, K40, K87 は塩基性アミノ酸残基であり、特に R38, K40 は真核生物においてよく保存されている残基である。

RACK1 の塩基性アミノ酸残基はその電荷から 18S rRNA と相互作用すると考えられてきたが、その詳しい相互作用は明らかになっていなかった。しかし近年、より解像度の高い構造解析によって RACK1 がリボソームタンパク質 rpS3, rpS16, rpS17 とともに相互作用しうることが明らかになった(Ben-Shem et al., 2011; Rabl et al., 2011)。テトラヒメナ (tt)RACK1 構造解析(PDB: 2XZN)から、Asc1 K40 に相当する残基 ttRACK1 K49 は 18S rRNA のリン酸残基と相互作用しう位置に位置しているが、ASC1 R38 に相当する残基 ttRACK1 R47 はリボソームタンパク質 rpS17 D27 と静電相互作用し得る位置に存在していることが明らかになっている。また、リボソームとの会合面に位置する芳香族残基 ASC1 W85, W150 に相当する ttRACK1 残基は rpS17 F30 と芳香環を介して相互作用しう。このように RACK1 は rpS17 の N 末領域と相互作用し得る。rpS16 との相互作用については RACK1 D109 残基が rpS16 の R33 と相互作用すると考えられる(Ikeuchi and Inada, 2016)。また、rpS3 は長く伸びた C 末領域が RACK1 のブレード 4 の端からブレード 5 のループ部にかけて重なっており相互作用し得ると考えられるが、rpS3 の C 末領域はフレキシブルなため、出芽酵母を始めとした構造解析では残基レベルでの rpS3 との相互作用を見ることが困難である。また、rpS3 の N 末領域はリボソーム A サイトを構成しているため、rpS3 を介して Dom34 と相互作用する可能性が考えられる。また、rpS3 は mRNA トンネル入り口の壁部を形成し、トンネル側に多数の塩基性アミノ酸残基が突出している(Rabl et al., 2011)。さらに rpS3 は大腸菌 *E. coli* の DNA エンドヌクレアーゼ III の配列が保存されており(Seong et al., 2012)、NGD のエンドヌクレアーゼの候補の一つとして期待される。

RACK1 には今回表現型が得られた残基以外にもよく保存されている残基が存在し、K87, R90, R127, K129, K176, D109Y, K216, K283, R311 等があげられる(Sengupta et al., 2004)。この内ブレード 7 に存在する K283 と R311 は knob 領域を含め、本研究では変異体の作製を行っていない。

4-4-3. 新たな NGD: Dead-End NGD における Asc1/RACK1 の機能

当研究室では *dom34* 欠損株において、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームのサブユニット解離が起きず、リボソームが停滞し続けることで、後続のリボソームがさらに翻訳伸長阻害を受け、NGD (Dead-End NGD)を引き起こすことを見出した (Tsuboi et al., 2012)。 *dom34* 欠損株において Dead-End NGD 由来と考えられる mRNA 断片が検出されたが、今回この mRNA 断片が RACK1 依存的に生じ、さらに RACK1 がリボソームに結合していることが mRNA 断片の産生に必須であることが明らかとなった。

この現象は RACK1 または RACK1 を介して結合する因子が切断に関与していることを強く示唆する。これは RACK1 のリボソームへの結合位置からも可能性が高いと考えられる。RACK1 が切断に関与している場合、ノンストップ mRNA の 3'末端にリボソームが蓄積しポリソームとして検出できると考え、ポリソーム解析によりペプチジル tRNA の検出を行なった。しかし、*ski2Δdom34Δrack1Δ*株と *ski2Δdom34Δ*株におけるペプチジル tRNA の局在はほぼ同じであった(図 4-5A)。以上から、次の 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、RACK1 非存在下では mRNA の切断が起きるが、その後 mRNA 断片が急速に分解されるため断片が検出されない、というモデルである。しかし既に *SKI2* 欠損株、*XRN1* 欠損株において断片が検出されないことを確認している。これを検証するためには *ski2Δdcp1ts* 株等を用いて断片の有無を解析する必要がある。2 つ目は、RACK1 非存在下では翻訳アレストに欠損を示すことから、末端で停滞せずに mRNA から脱落している可能性である。この場合 *ski2Δdom34Δasc1Δ*株を用いたポリソーム解析で 80S にペプチジル tRNA が蓄積することが予想されたが、*ski2Δdom34Δ*株とほとんど変化がなかった。しかしリボソームに結合しないフリーの GFP-Rz タンパク質が増加していることから、mRNA からリボソームが脱落した後、ペプチド鎖が解離している可能性が考えられる。Dead-End NGD は新しく発見した現象であるため、今後さらなる解析を検討している。また、細胞増殖に影響が生じる原因と合わせて、ノンストップ mRNA の品質管理機構の全貌を明らかにしたい。

4-4-4. 品質管理機構の保存性

ヒト Pelota に関して、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームのサブユニット解離活性が保存されていることが示唆された。出芽酵母 Dom34 およびヒト Pelota は構造学的に類似の構造を形成しているが、残基レベルでは異なる部分も存在する。近年、出芽酵母 Dom34 が 80S リボソームに結合した極低温電子顕微鏡構造、および哺乳類 Pelota がウサギ 80S リボソームに結合した極低温電子顕微鏡構造が相次いで明らかにされ、リボソーム A サイトの mRNA トンネル部分に N 末ドメインが相互作用する形で結合することが明らかにされた(Hilal et al., 2016; Shao et al., 2016)。一方で、ポリ A 鎖の途中で停滞した場合、すなわち A サイトに mRNA が存在する場合にも Pelota が A サイトに入り、リボソームの解離を促進するか否かに関しては、議論の余地がある。ポリ A 鎖を翻訳しているリボソームの精製には *in vitro* 翻訳系を使用したものが多く、構造解析の基質として使用した場合、本当に均一な「ポリ A 鎖上のリボソーム」となっているのかについては疑問が残る。実際、極低温電子顕微鏡構造ではポリ A 鎖を翻訳しているリボソームを基質とした場合でも、Pelota が結合した構造では A サイト以降の mRNA の density は観察されていない。

また、今回の実験系においては Hbs1L の機能を解析することはできなかった。Pelota が単体で機能を発揮できた理由としてはいくつか考えられる。出芽酵母中の Hbs1 が存在しない条件下で解析を行なっていることから、1). Pelota 単体で機能できる可能性、2). eRF3、eEF1A、Ski7 等の他の GTPase と相互作用して活性を獲得した可能性、が考えられる。確かに、哺乳類の Pelota は Hbs1 以外に、Hbs1 や Ski7 のオルソログとされている G タンパク質である GTPBP1 や GTPBP2 とともに相互作用し、機能することが知られており、酵母細胞内で他の GTPase と相互作用した可能性は否定できない。また、RACK1 や ZNF598 のような翻訳伸長停滞したリボソームに起因する品質管理機構に必須な因子もヒトまで保存されていることから、今後、品質管理機構の解析には高等真核生物の

培養細胞や個体レベルの解析が要求されると考える。NMD の疾患との関連性から、NSD や NGD、RQC が遺伝性疾患や体細胞変異に由来する疾患と密接に関わっている可能性が高く、出芽酵母レベルでの分子機構の知見は将来の疾患メカニズムへの理解にも繋がると期待している。

第 5 章

材料と実験方法

第 5 章 材料と方法

5-1. 出芽酵母株

本研究では表 1 に示す出芽酵母株を用いて実験を行った。

5-2. プラスミド

本研究では表 2 に示すプラスミドを用いて実験を行った。

5-3. 実験方法

5-3-1. 培地

出芽酵母の培養には以下の培地†を用いた。

- i. YPD 培地: 1% w/v yeast extract, 2% w/v polypeptone, 2% w/v glucose
- ii. SDC 培地: yeast nitrogen base without amino acids 6.7g/L, アミノ酸混合物 1.3g/L, 2% w/v glucose
- iii. *GAL1* プロモーター誘導用 SC 培地: yeast nitrogen base without amino acids 6.7g/L, アミノ酸混合物 1.3g/L, 2% w/v galactose
- iv. ラフィノース SC 培地: yeast nitrogen base without amino acids 6.7g/L, アミノ酸混合物 1.3g/L, 2% w/v raffinose

(† 寒天培地は 2% w/v agar を添加した。)

SC 系培地は必要に応じてアミノ酸、塩基を除いて使用した。

出芽酵母遺伝子欠損株作製用培地には必要に応じて各種抗生物質、薬剤を添加した。

G418: 200 μ g/mL、hygromycin: 300 μ g/mL、clonNAT: 100 μ g/mL、5-FOA: 500 μ g/mL

出芽酵母薬剤感受性試験用培地には必要に応じて各種試薬を添加した。

cycloheximide: 10ng/mL、anisomycin: 10 μ g/mL

CUP1 プロモーターの誘導時には最終濃度 0.1mM の硫酸銅(II)を培地に添加し、2 時間培養後集菌した。

ポリソーム解析用サンプルの集菌時には最終濃度 0.1mg/mL の cycloheximide を培地に添加後、氷水浴にて急冷し、5 分後に集菌した。

大腸菌の培養には以下の培地を用いた。

LB 培地: 0.5% w/v yeast extract, 1% w/v tryptone, 1% w/v NaCl, pH7.2~7.5

寒天培地は2% w/v agarを添加した。

必要に応じて各種抗生物質を添加した。

ampicillin: 50 μ g/mL、kanamycin: 20 μ g/mL、chloramphenicol: 35 μ g/mL

5-3-2. 遺伝子欠損株の構築

Baudin らにより開発された PCR を利用した遺伝子欠損株作成法により、遺伝子欠損株を作成した(Baudin *et al.* 1993)。ゲノムにコードされている遺伝子の 5'末端上流配列と 3'末端下流配列各 40 塩基を MX4、MX6、NT2 各カセットの共通配列(S2、F2 など(Janke *et al.*, 2004))の上流側に繋いだプライマーを作製し、カセット内の薬剤耐性遺伝子(*kanR*, *hph*, *natR*)配列もしくはアミノ酸合成遺伝子(*HIS3*, *TRP1*)配列を増幅させる。PCR 産物を親となる酵母株に導入後、寒天培地上で生育し、薬剤存在下またはアミノ酸非存在下で生育したコロニーを単離した。各コロニーの遺伝子が薬剤耐性遺伝子またはアミノ酸合成遺伝子に置き換わったことを PCR 法により確認した。さらに、得られた候補株から RNA サンプルを調製し、転写産物が欠失していることをノーザンブロット法により

確認し、遺伝子欠損株とした。

ある必須遺伝子のシャッフル株の場合、親となる酵母株に、*URA3* をマーカーに持つ p416-プラスミドベクターを用いて野生型の必須遺伝子を導入後、上記と同様の方法でゲノムの必須遺伝子を欠失させた。コロニーPCR 法によりゲノム中の遺伝子欠失を確認した後、候補株が SDC 5-FOA 培地にて生育できないことを確認した。(5-FOA 存在下では *URA3* 遺伝子を保持する酵母株は生育できない。ゲノムの必須遺伝子が欠失した株は、必須遺伝子をコードする p416-プラスミドベクター(*URA3*⁺)を保持しなければ生育できないため、5-FOA 存在下では生育できない。)

必須遺伝子の変異体をシャッフル株に導入する場合は以下の方法を用いた。p414(*TRP1*)または p415(*LEU2*)プラスミドベクターにクローニングした必須遺伝子の野生型または変異体をシャッフル株に導入し培養した。生育したコロニーを SDC 5-FOA 培地に画線し、5-FOA 存在下で生育したコロニーを単離し、目的の変異株とした。

5-3-3. RNA 抽出

SDC 液体培地または至適培地を用いて、30°Cで OD₆₀₀=0.6 まで培養した後、培養液 10mL を遠心分離(3,500rpm, 2min., RT)により集菌した。氷上で RNA buffer 300μL に懸濁し、RNA 用フェノール 300μL を加え Vortex ミキサーを用いて良く混合した。65°Cで 5 分間静置した後、5 分氷冷した。遠心分離(13,000rpm, 5min., RT)後、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。再び RNA 用フェノール 300μL を加え、Vortex ミキサーを用いて良く混合した後、65°Cで 5 分間静置し、その後 5 分氷冷した。遠心分離(13,000rpm, 5min., RT)後、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。フェノール／クロロホルム 300μL を加え、Vortex ミキサーを用いて良く混合した後、遠心分離(13,000rpm, 5min., RT)を行ない、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。最後に PCI (フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、量比 25: 24: 1 の混合物。) 300μL を加え、Vortex ミキサーを用いて良く混合した後、遠心分離(13,000rpm, 5min.,

RT)を行ない、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。プライマーエクステンション法や RT-PCR の鋳型とする場合は、さらに CI (クロロホルム、イソアミルアルコール、量比 24: 1 の混合物。) 300 μ L を加え、Vortex ミキサーを用いて良く混合した後、遠心分離(13,000rpm, 5min., RT)を行ない、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。エタノール沈殿を行い、得られた RNA ペレットを DEPC 処理水 50 μ L を加えて溶解し RNA 試料とした。

RNA 半減期測定用の集菌の場合、SC ガラクトース培地を用いて OD₆₀₀=0.5-0.6 まで培養した後、SDC 培地に交換し、経時的に 1.5mL ずつ集菌した。氷上で RNA buffer 200 μ L に懸濁し、RNA 用フェノール 200 μ L を加え Vortex ミキサーを用いて良く混合した。65°C で 5 分間静置した後、5 分氷冷した。遠心分離(13,000rpm, 5min., RT)後、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。PCI (フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、量比 25: 24: 1 の混合物。) 200 μ L を加え、Vortex ミキサーを用いて良く混合した後、遠心分離(13,000rpm, 5min., RT)を行ない、得られた上清を新しい 1.5mL チューブに移した。エタノール沈殿を行い、得られた RNA ペレットを DEPC 処理水 30 μ L を加えて溶解し RNA 試料とした。

RNA buffer: 20mM Tris pH9.5, 30mM NaCl, 10mM EDTA, 1% SDS

5-3-4. Northern blotting

5-2-4-1. アガロースゲル電気泳動を用いた Northern blotting

RNA 試料に関して、nanodrop を使用して RNA 濃度を測定後、RNA 2 μ g/6 μ L に濃度調製した。RNA 6 μ L に対して RNA sample buffer 27 μ L を加えて混合し、74°C で 10min 加熱後、氷上で急冷した。これをサンプルとし、1.2% アガロース 1x MOPS ゲルおよび 1x MOPS buffer を用いて電気泳動(200V, 40 min.)を行った。泳動後、20xSSC を用いたキャピラリーブロットティング法により、RNA を Amersham HybondTM-N⁺メンブレン(GE Healthcare)に転写した。転写後、UV 照射により RNA をメンブレンに架橋固定した。

DIG Easy Hyb Granules (Roche)とメンブレンをシリンダーに入れ 50℃で 1 時間インキュベートした後、Digoxigenin(DIG)-11-dUTP で標識したプローブをシリンダーに入れ、50℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、メンブレンを wash buffer 1 (50℃, 15min.), wash buffer 2 (50℃, 15min., 2 回)を用いて洗浄した後、マレイン酸バッファーを用いて希釈した 1x Blocking Reagent を用いて 30 分間ブロッキングを行い、抗 DIG-AP 抗体と反応させた(60min.)。wash buffer 3 を用いてメンブレンを洗浄(10min., 3 回)後、wash buffer 4 を用いてメンブレンを pH9.5 に平衡化(10min.)させた。検出には CDP-Star を基質として使用し、LAS-3000 mini (FUJIFILM)または LAS-4000 mini (GE Healthcare)を用いて検出を行った。

RNA sample buffer: 60% DMSO, 20% glyoxal, 5mM NaOAc, 1mM EDTA, 20mM MOPS, 5% glycerol, 0.1mg/ml Bromophenol Blue, 0.1mg/ml xylene cyanol

10×MOPS buffer(pH7.0): 0.2M MOPS, 50mM NaOAc, 10mM EDTA

20×SSC: 3M NaCl, 0.3M sodium citrate

wash buffer 1: 2×SSC, 0.1% SDS

wash buffer 2: 0.1×SSC, 0.1% SDS

wash buffer 3: 0.1M maleic acid, 0.3% Tween-20

wash buffer 4: 0.1M Tris-HCl pH9.5, 0.1M NaCl

Anti-digoxigenin-AP: Roche

DIG-DNA labeling Kit: Roche

CDP-Star detection kit: Amersham (GE Healthcare)

5-2-4-2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた Northern blotting

RNA 試料を 2μg/6μL に濃度調製し、RNA 6μL に対して 2x TBE-Urea sample buffer 6μL を加えて混合し、70℃で 3 分間加熱後、氷上で急冷した。これをサンプルとし、6% アクリルアミド TBE-urea ゲルおよび 1x TBE buffer を用いて電気泳動(180V, 40 min.)を行

った。泳動後、0.5x TBE buffer およびセミドライトランスファー装置を用いて、RNA を Zeta-Probe® GT Genomic Tested Blotting Membrane (Bio-Rad) に転写(400mA, 108min.) した。転写後、UV 照射により RNA をメンブレンに架橋固定した。以降の操作は 5-2-4-1 と同様に行なった。

2x TBE-Urea sample buffer: Novex®, in vitro

10x TBE buffer: 890mM Tris base, 890mM borate, 20mM EDTA pH8.0

5-3-5. タンパク質の抽出

SDC 液体培地または至適培地を用いて、30°C で $OD_{600}=0.6$ まで培養した後、培養液 10mL を遠心分離(3500rpm, 2min., RT)により集菌した。氷冷した TCA buffer 500 μ L を加えて懸濁し、氷冷した 20% TCA 500 μ L と 0.5mm Zircunia/Silica Beads 500 μ L を含む 1.5mL チューブに加えた。ボルテックス(30sec., 3 回)により菌体を破碎し、上清を新しい 1.5mL チューブに移した。ビーズに再度氷冷した TCA buffer 500 μ L を加えてボルテックス(30sec., 1 回)し、上清を前に取った上清と同じチューブに移した。遠心分離(13000rpm, 10min., 4°C)を行い、上清を良く除いた後、沈殿を SDS Sample buffer 150 μ L に溶かし、95°C で 10 分間加熱した。室温に戻した後、遠心分離(13000rpm, 10min., RT)を行い不溶性タンパクを沈殿後、上清をタンパク質試料とした。

TCA buffer: 20mM Tris-HCl(pH6.8), 50mM NH_4OAc , 200mM EDTA, 1mM pmsf

SDS Sample buffer: 7% SDS, 30% glycerol, 200mM Tris base, 20mM EDTA, 1M DTT, 0.1% Bromophenol Blue

5-3-6. Western blotting

精製タンパク質もしくは TCA 沈殿によるタンパク質試料 5-10 μ L を SDS-PAGE もしくは Nu-PAGE により分離泳動した。泳動後のゲルを Cathode buffer で平衡化した。PVDF

メンブレンはメタノールで洗浄し、Anode buffer 2 で平衡化した。セミドライトランスファー装置の陽極側に Anode buffer 1 に浸したろ紙 2 枚、Anode buffer 2 に浸したろ紙 1 枚、Anode buffer 2 で平衡化した PVDF メンブレン、Cathode buffer で平衡化したゲル、Cathode buffer に浸したろ紙 2 枚の順番で重ね、ゲルからメンブレンにタンパク質を転写(面積(cm²)x3 mA, 30min.)した。転写後、5%スキムミルク PBS/0.1% Tween-20 を用いてメンブレンをブロッキングし、一次抗体反応を行った。メンブレンを PBS/0.1% Tween-20 で洗浄(10min., 3 回)後、さらに二次抗体反応を行った。その後、ImmunoStar-LD® (Wako)等の検出試薬を使用し、LAS-3000 mini (FUJIFILM)または LAS-4000 mini (GE Healthcare)を用いて検出を行った。

Anode buffer 1: 20% methanol, 300mM Tris-HCl(pH10.4)

Anode buffer 2: 20% methanol, 25mM Tris-HCl(pH10.4)

Cathode buffer: 0.04M Glycine, 20% methanol, 25mM Tris-HCl(ph9.4)

PVDF membrane: Immobilon®-P (Millipore)

抗 FLAG 抗体: FLAG (M2) mouse monoclonal antibody (Sigma)

抗 HA 抗体: HA (3F10) rat monoclonal antibody, HRP-conjugated (Roche)

抗 Myc 抗体: rabbit polyclonal antibody (Sigma)

抗 GFP 抗体 : GFP (B-2) mouse monoclonal antibody (Santa Cruz)

抗 Ub 抗体: Ub (P4D1) mouse monoclonal antibody (Santa Cruz)

抗 Ub-K48 抗体: Ub-K48 (D9D5) rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)

抗 eEF1 α 抗体: rabbit polyclonal antibody (Lab stock)

抗 eEF2 抗体: rabbit polyclonal antibody (Lab stock)

抗 Rpl23 抗体: rabbit polyclonal antibody (Abcam)

抗 Asc1 抗体: rabbit polyclonal antibody (Lab stock)

抗 mouse 抗体: anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked-whole antibody (from sheep)
(GE Healthcare)

抗 rabbit 抗体: anti rabbit IgG horseradish peroxidase linked-whole antibody (from donkey)
(GE Healthcare)

PBS/0.1% Tween-20: 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH7.5), 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20

ImmunoStar-LD (Wako)

5-3-7. ポリソーム解析

出芽酵母株を 30°C で OD₆₀₀=0.8 まで培養した後、培養液 1 を遠心分離(3500rpm×5min RT)により集菌し、液体窒素を用いて凍結した。必要に応じて集菌直前に 0.1mg/mL cycloheximide を添加し、5 分間氷浴にて静置後集菌した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素存在下で破碎し、lysis buffer (3mL/1L cel)l に溶解後、遠心分離(3500rpm, 2min., 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清をさらに遠心分離(15,000rpm, 15min., 4°C)し、上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液(RNA 換算で 2-2.5mg 分)を Gradient master (BIO COMP)により作製した 10-50%スクロース溶液に重層した。これを 10-50%スクロース密度勾配遠心(27000rpm, 3h, 4°C)により分離し、BIO-MINI UV MONITOR(ATTO)による A260 測定並びに Position Gradient Fractionator(TOWA LABO, BIO-COMP)によりポリソームの分画を行った。ショ糖密度勾配遠心法後に分画した各サンプルをウエスタンブロッティング用に調製する際は、適当量のサンプルに当量の 2x SDS Sample buffer を加え、95°C で 10 分間加熱した。室温にて冷却後、遠心分離(13000rpm 10min RT)を行い、上清をタンパク質試料とした。また、分画した各サンプルの RNA 抽出は、変性剤としてグアニジン塩酸を用いた、エタノール沈殿法により行なった。ペプチジル tRNA を観察する際には、適当量のサンプルに 50°C の 4x SDS sample buffer pH6.8 を加えた後、室温にて 30 分間インキュベートし、Nu-PAGE 用のサンプルとした。

lysis buffer: 20mM HEPES(pH7.4), 2mM Mg(OAc)₂, 100mM KOAc, 0.5 mM DTT, 1mM PMSF, cOmplete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

10% sucrose solution: 10% sucrose, 10mM Tris, 70mM NH₄OAc, 4mM Mg(OAc)₂

50% sucrose solution: 50% sucrose, 10mM Tris, 70mM NH_4OAc , 4mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$

5-3-8. スポットアッセイ

出芽酵母コロニーを 2mL の SC -Ura +Raffinose 培地にて 30°C 振盪培養を 2 日行なった。酵母液の濁度(OD_{600} 値)を測定、それぞれ $\text{OD}_{600}=0.3$ に希釈し、これを基準として、10 倍希釈系列を作成した (4 点)。それぞれ 4 μL ずつ SC -Ura +Galactose プレートおよび SC -Ura +Glucose プレートにスポットし、30°C にて培養を行なった。

5-3-8. タンパク質・複合体精製法

・ FLAG 精製(リボソーム精製、Hel2-FLAG 精製)

YPD または SDC 液体培地にて、30°C で $\text{OD}_{600}=0.7-0.8$ まで培養した後、培養液 200mL を遠心分離(6,000rpm×5min RT) により集菌し、液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、IXA-150 buffer 600 μL に溶解後、遠心分離(21,500 $\times g$ ×30min 4°C) により不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液(ライセート)とした。予め IXA-150 buffer にて平衡化した anti-DYKDDDDK tag resin (Wako) 50 μL とインキュベートした(1hr, 4°C)。バッチ法によりビーズを IXA-150 buffer で 5 回洗浄し、0.25mg/ml FLAG peptide 含有 IXA-150 buffer により競合的に溶出した(30min, 4°C)。

lysis buffer: 20mM HEPES(pH7.4), 2mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 100mM KOAc, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free (Roche) 1tablet/10 ml

IXA-150 buffer: 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM KCl, 12mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 1mM DTT, 1mM PMSF

・ Split-tag purification (STP)法

SDC 液体培地にて、30°C で $\text{OD}_{600}=0.7-0.8$ まで培養した後、培養液 1L を遠心分離

(6,000rpm×5min RT) により集菌し、液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、lysis buffer (+cOmplete mini EDTA-free) 10mL に溶解後、遠心分離(40,000 xg ×30min 4°C) により不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液(ライセート)とした。予め lysis buffer にて平衡化した IgG-conjugated dynabeads M-270 epoxy (Invitrogen) 50μL とインキュベートした(1hr, 4°C)。バッチ法によりビーズを lysis buffer で 3 回洗浄後、His-TEV protease 反応を行なった(2hr, 4°C)。溶出画分と、予め lysis buffer にて平衡化した anti-DYKDDDDK tag resin (Wako) 50μL を混合し、インキュベートした(1hr, 4°C)。バッチ法によりビーズを lysis buffer で 3 回洗浄後、0.25mg/ml FLAG peptide 含有 lysis buffer により競合的に溶出した(30min, 4°C)。

lysis buffer: 20mM HEPES(pH7.4), 10mM MgCl₂, 100mM KOAc, 0.0075%v/v NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, (option: cOmplete mini EDTA-free (Roche) 1 tablet/10 ml)

5-3-9. プライマーエクステンション法

出芽酵母から抽出した Total RNA を鋳型として、5' 側に IRDye-700 蛍光ラベルしたプライマーを用いて逆転写酵素キット SuperScript-III (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行なった。また、同一のプライマーを用いて、鋳型 DNA のシークエン斯拉ダーを Thermo Sequenase™ cycle sequencing kit を用いて調製した。逆転写サンプルをシークエン斯拉ダーとともに 5% TBE-Urea PAGE により展開し(1,000V, 3hr)、プライマーに標識した IRDye-700 の蛍光を FLA-9000 (Fujifilm) を用いて検出した。逆転写に使用したプライマー配列を以下に示す。

HIS3 bottom 1 primer (5'-TATCGCTAGGGGACCACCCTTTA-3')

GFP bottom primer (5'-GTATAGTTCATCCATGCCATG-3')

5-3-10. 試験管内ユビキチン化反応

基質となるリボソームは Rpl25-FLAG を発現する *RPS20-3HA*, *hel2Δ*株または

RPS20-3HA, *hel2Δasc1Δ*株から抗 FLAG 抗体を用いて精製した。E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 は Hel2-FLAG を過剰発現する出芽酵母細胞から抗 FLAG 抗体を用いて精製した。E2 ユビキチン結合酵素 Ubc4 は *pGEX-6P-UBC4* を導入した大腸菌株 BL21(DE3)から、Glutathion Sepharose 4BTM (GE Healthcare)を用いて精製後、還元型グルタチオンを用いて溶出した。PreScission Protease (GE Healthcare)を用いて GST タグを切断後、Glutathion Sepharose 4BTM (GE Healthcare)を用いて GST を取り除き、精製 Ubc4 とした。E1 ユビキチン活性化酵素はヒト UBE1 (UBPBio)を使用した。また、ユビキチン化ヒトユビキチン (タグ無しおよび N 末 His タグを付加)野生型および K63R 変異体(UBPBio)を使用した。反応バッファー(20mM HEPES-KOH pH7.4, 100mM KOAc, 10mM MgCl₂, 1mM DTT)に 50μM ユビキチン、100nM UBE1、300nM Ubc4、100nM Hel2-FLAG、500nM リボソーム、1mM ATP、10mM クレアチンリン酸、20μg/mL クレアチンキナーゼを添加混合し、26℃において 15-30 分間インキュベートした。反応停止時に 4x SDS サンプルバッファーを添加した。サンプルは抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

参考文献

- Adams, D.R., Ron, D., and Kiely, P. a (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun. Signal.* 9, 22.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112–118.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803–808.
- Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M. (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat. Cell Biol.* 10, 1324–1332.
- Arthur, L.L., Pavlovic-djuranovic, S., Koutmou, K.S., and Green, R. (2015). Translational control by lysine-encoding A-rich sequences. *Sci. Adv.*
- Auld, D.S., Thorne, N., Maguire, W.F., and Inglese, J. (2009). Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3585–3590.
- Bartel, B., Wüning, I., and Varshavsky, A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J.* 9, 3179–3189.
- Barthelme, D., and Sauer, R.T. (2012). Identification of the Cdc48•20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science* 337, 843–846.
- Baum, S., Bittins, M., Frey, S., and Seedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem. J* 830, 823–830.
- Becker, T., Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Sieber, H., Motaal, B.A., Mielke, T., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2011). Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 715–720.
- Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Saulière, J., Wittkopp, N., and Izaurralde, E. (2007). mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett.* 581, 2845–2853.
- Belew, A.T., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Advani, V.M., Sulima, S.O., Kasprzak, W.K., Shapiro, B. a, and Dinman, J.D. (2014). Ribosomal frameshifting in the CCR5 mRNA is regulated by miRNAs and the NMD pathway. *Nature* 512, 265–269.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution.

Science 334, 1524–1529.

Bengtson, M.H., and Joazeiro, C. a P. (2010). Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* 467, 470–473.

Brandman, O., and Hegde, R.S. (2016). Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 7–15.

Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.-W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., et al. (2012). A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151, 1042–1054.

Bühler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2006). EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 462–464.

Cebollero, E., Reggiori, F., and Kraft, C. (2012). Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 182834.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhäuser, N., Carlo Marchisio, P., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 579–584.

Chang, B.Y., Harte, R.A., and Cartwright, C.A. (2002). RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene* 21, 7619–7629.

Chen, L., Muhlrads, D., Hauryliuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., and Song, H. (2010). Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 VN-r, 1233–1240.

Chen, S., Lin, F., Shin, M.E., Wang, F., Shen, L., and Hamm, H.E. (2008). RACK1 regulates directional cell migration by acting on G betagamma at the interface with its effectors PLC beta and PI3K gamma. *Mol. Biol. Cell* 19, 3909–3922.

Choe, Y.-J., Park, S.-H., Hassemer, T., Körner, R., Vincenz-Donnelly, L., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. *Nature* 1–17.

Chu, J., Hong, N. a, Masuda, C. a, Jenkins, B. V, Nelms, K. a, Goodnow, C.C., Glynne, R.J., Wu, H., Masliah, E., Joazeiro, C. a P., et al. (2009). A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2097–2103.

Cole, S.E., LaRiviere, F.J., Merrikh, C.N., and Moore, M.J. (2009). A convergence of

- rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. *Mol. Cell* 34, 440–450.
- Colobran, R., Lois, S., de la Cruz, X., Pujol-Borrell, R., Hernández-González, M., and Guilarte, M. (2014). Identification and characterization of a novel splice site mutation in the SERPING1 gene in a family with hereditary angioedema. *Clin. Immunol.* 150, 143–148.
- Coyle, S.M., Gilbert, W. V., and Doudna, J. a (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1626–1634.
- Defenouillere, Q., Zhang, E., Namane, A., Mouaikel, J., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2016). Rqc1 and Ltn1 prevent CAT-tail induced protein aggregation by efficient recruitment of Cdc48 on stalled 60S subunits. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.722264.
- Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., et al. (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5046–5051.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 284, 10343–10352.
- Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561–564.
- Duttler, S., Pechmann, S., and Frydman, J. (2013). Principles of cotranslational ubiquitination and quality control at the ribosome. *Mol. Cell* 50, 379–393.
- van den Elzen, A.M.G., Henri, J., Lazar, N., Gas, M.E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., van Tilbeurgh, H., Séraphin, B., and Graille, M. (2010). Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1446–1452.
- Fang, N.N., Zhu, M., Rose, A., Wu, K.-P., and Mayor, T. (2016). Deubiquitinase activity is required for the proteasomal degradation of misfolded cytosolic proteins upon heat-stress. *Nat. Commun.* 7, 12907.
- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L., and Link, A.J. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* 20, 1294–1307.

- Fong, H.K., Hurley, J.B., Hopkins, R.S., Miake-Lye, R., Johnson, M.S., Doolittle, R.F., and Simon, M.I. (1986). Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2162–2166.
- Frischmeyer, P.A., Hoof, A. Van, and Dietz, H.C. (2002). An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination. *Science* 295, 2258–2262.
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Miyata, A., and Ohno, M. (2009). A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* 23, 963–974.
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., and Ohno, M. (2012). 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO J.* 31, 2579–2589.
- Gamble, C.E., Brule, C.E., Dean, K.M., Fields, S., Grayhack, E.J., Gamble, C.E., Brule, C.E., Dean, K.M., Fields, S., and Grayhack, E.J. (2016). Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast. *Cell* 1–12.
- Gandin, V., Senft, D., Topisirovic, I., and Ronai, Z. a (2013). RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis. *Genes Cancer* 4, 369–377.
- Gerbasi, V.R., Weaver, C.M., Hill, S., Friedman, D.B., and Link, A.J. (2004). Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8276–8287.
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., and Conti, E. (2006). Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J.* 25, 5117–5125.
- Graber, J.H., Cantor, C.R., Mohr, S.C., and Smith, T.F. (1999). In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14055–14060.
- Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., and Conti, E. (2013). The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* 154, 814–826.
- Hashimoto, Y., Takahashi, M., Sakota, E., and Nakamura, Y. (2017). Nonstop-mRNA decay machinery is involved in the clearance of mRNA 5'-fragments produced by RNAi and NMD in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484, 1–7.
- Hicke, L., Schubert, H.L., and Hill, C.P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 610–621.

- Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Bürger, J., Mielke, T., and Spahn, C.M.T. (2016). Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution. *Nat. Commun.* 7, 13521.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., and Bader, G. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 2–5.
- Hoffman, E.P., Morgan, J.E., Watkins, S.C., and Partridge, T.A. (1990). Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J. Neurol. Sci.* 99, 9–25.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., and Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262–2264.
- Hunt, R.C., Simhadri, V.L., Iandoli, M., Sauna, Z.E., and Kimchi-Sarfaty, C. (2014). Exposing synonymous mutations. *Trends Genet.* 30, 308–321.
- Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem. J.* 399, 361–372.
- Ikeuchi, K., and Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci. Rep.* 6, 28234.
- Ikeuchi, K., Yazaki, E., Kudo, K., and Inada, T. (2016). Conserved functions of human Pelota in mRNA quality control of nonstop mRNA. *FEBS Lett.* 590, 3254–3263.
- Inada, T., and Aiba, H. (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* 24, 1584–1595.
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., and Weissman, J.S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218–223.
- Ishimura, R., Nagy, G., Dotu, I., Zhou, H., Yang, X.-L., Schimmel, P., Senju, S., Nishimura, Y., Chuang, J.H., and Ackerman, S.L. (2014). Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. *Science* (80-.). 345, 455–459.
- Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2007). Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* 21, 519–524.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H.,

- Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* *21*, 947–962.
- Jannot, G., Bajan, S., Giguère, N.J., Bouasker, S., Banville, I.H., Piquet, S., Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2011). The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep.* *12*, 581–586.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a surveillance mechanism that degrades mRNA containing premature termination codons (PTCs). In mammalian cells, recognition of PTCs requires translation and depends on the presence on the mRNA with the splicing-depend. *Genes Dev.* 355–367.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I.J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002). Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNAⁱ Met)–Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules. *Mol. Biol. Cell* *13*, 195–210.
- Kervestin, S., and Jacobson, A. (2012). NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 700–712.
- Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T., and Nureki, O. (2010). Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17575–17579.
- Kong, J., and Liebhaber, S.A. (2007). A cell type-restricted mRNA surveillance pathway triggered by ribosome extension into the 3' untranslated region. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 670–676.
- Kouba, T., Rutkai, E., Karásková, M., and Valášek, L.S. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res.* *40*, 2683–2699.
- Kowalinski, E., Schuller, A., Green, R., and Conti, E. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* Ski7 Is a GTP-Binding Protein Adopting the Characteristic Conformation of Active Translational GTPases. *Structure* *23*.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., et al. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* *510*, 162–166.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are

- selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* *10*, 602–610.
- Kugler, K.G., Jandric, Z., Beyer, R., Klopff, E., Glaser, W., Lemmens, M., Shams, M., Mayer, K., Adam, G., and Schüller, C. (2016). Ribosome quality control is a central protection mechanism for yeast exposed to deoxynivalenol and trichothecin. *BMC Genomics* *17*, 417.
- Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *EMBO Rep.* *10*, 1265–1271.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* *11*, 956–961.
- Kuroha, K., Ando, K., Nakagawa, R., and Inada, T. (2013). The Upf factor complex interacts with aberrant products derived from mRNAs containing a premature termination codon and facilitates their proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* *288*, 28630–28640.
- Lareau, L.F., Hite, D.H., Hogan, G.J., and Brown, P.O. (2014). Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments. *Elife* *3*, e01257.
- Lariviere, F.J., Cole, S.E., Ferullo, D.J., and Moore, M.J. (2006). A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol. Cell* *24*, 619–626.
- Lee, H.H., Kim, Y.S., Kim, K.H., Heo, I., Kim, S.K., Kim, O., Kim, H.K., Yoon, J.Y., Kim, H.S., Kim, D.J., et al. (2007). Structural and Functional Insights into Dom34, a Key Component of No-Go mRNA Decay. *Mol. Cell* *27*, 938–950.
- Letzring, D.P., Wolf, A.S., Brule, C.E., and Grayhack, E.J. (2013). Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA* *19*, 1208–1217.
- Li, A., Vargas, C. a, Brykailo, M. a, Openo, K.K., Corbett, A.H., and Fridovich-Keil, J.L. (2004). Both KH and non-KH domain sequences are required for polyribosome association of Scp160p in yeast. *Nucleic Acids Res.* *32*, 4768–4775.
- Link, a J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., and Yates, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* *17*, 676–682.

- Lu, J., Kobertz, W.R., and Deutsch, C. (2007). Mapping the Electrostatic Potential within the Ribosomal Exit Tunnel. *J. Mol. Biol.* *371*, 1378–1391.
- Lu, J., Sun, M., and Ye, K. (2013). Structural and functional analysis of Utp23, a yeast ribosome synthesis factor with degenerate PIN domain. *RNA* *19*, 1815–1824.
- Majzoub, K., Hafirassou, M.L., Meignin, C., Goto, A., Marzi, S., Fedorova, A., Verdier, Y., Vinh, J., Hoffmann, J.A., Martin, F., et al. (2014). RACK1 Controls IRES-Mediated Translation of Viruses. *Cell* *159*, 1086–1095.
- Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S., and Inada, T. (2014). Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells* *19*, 1–12.
- Matsuo, Y., Granneman, S., Thoms, M., Manikas, R.-G., Tollervey, D., and Hurt, E. (2014). Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* *505*, 112–116.
- McLeod, M., Shor, B., Caporaso, A., Wang, W., Chen, H., and Hu, L. (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase To regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4016–4027.
- Mishima, Y., and Tomari, Y. (2016). Codon Usage and 3' UTR Length Determine Maternal mRNA Stability in Zebrafish. *Mol. Cell* *61*, 874–885.
- Morita, M., Ler, L.W., Fabian, M.R., Siddiqui, N., Mullin, M., Henderson, V.C., Alain, T., Fonseca, B.D., Karashchuk, G., Bennett, C.F., et al. (2012). A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3585–3593.
- Muhrad, D., and Parker, R. (1999). Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* *5*, 1299–1307.
- Nakatogawa, H., and Ito, K. (2001). Secretion monitor, secM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol. Cell* *7*, 185–192.
- Nakatogawa, H., and Ito, K. (2002). The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* *108*, 629–636.
- Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Mol. Cell* *64*, 251–266.
- Oliver, D., Norman, J., and Sarker, S. (1998). Regulation of *Escherichia coli* secA by Cellular Protein Secretion Proficiency Requires an Intact Gene X Signal Sequence and

- an Active Translocon. *J. Bacteriol.* *180*, 27–30.
- Otsuka, M., Takata, A., Yoshikawa, T., Kojima, K., Kishikawa, T., Shibata, C., Takekawa, M., Yoshida, H., Omata, M., and Koike, K. (2011). Receptor for activated protein kinase C: requirement for efficient microRNA function and reduced expression in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* *6*, e24359.
- Panasenko, O.O., and Collart, M. a (2012). Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Mol. Microbiol.* *83*, 640–653.
- Pashkova, N., Gakhar, L., Winistorfer, S.C., Yu, L., Ramaswamy, S., and Piper, R.C. (2010). WD40 repeat propellers define a ubiquitin-binding domain that regulates turnover of F box proteins. *Mol. Cell* *40*, 433–443.
- Passos, D.O., Doma, M.K., Christopher Shoemaker, Muhlrads, D., Green, R., Weissman, J., Hollien, J., and Parker, R. (2009). Analysis of Dom34 and Its Function in No-Go Decay. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3025–3032.
- Pechmann, S., and Frydman, J. (2013). Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 237–243.
- Pechmann, S., Chartron, J.W., and Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* *21*, 1–9.
- Pisarev, A. V, Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* *131*, 286–299.
- Pisarev, A. V, Skabkin, M. a, Pisareva, V.P., Skabkina, O. V, Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* *37*, 196–210.
- Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T. V, and Pisarev, A. V (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* *30*, 1804–1817.
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K.E., Graveley, B.R., et al. (2015). Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability. *Cell* *160*, 1111–1124.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* *331*, 730–736.

- Saito, K., Horikawa, W., and Ito, K. (2015). Inhibiting K63 Polyubiquitination Abolishes No-Go Type Stalled Translation Surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.* *11*, e1005197.
- Saito, S., Hosoda, N., and Hoshino, S. (2013). The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 17832–17843.
- Sakata, E., Stengel, F., Fukunaga, K., Zhou, M., Saeki, Y., Förster, F., Baumeister, W., Tanaka, K., and Robinson, C. V. (2011). The Catalytic Activity of Ubp6 Enhances Maturation of the Proteasomal Regulatory Particle. *Mol. Cell* *42*, 637–649.
- Sakata, E., Bohn, S., Mihalache, O., Kiss, P., Beck, F., Nagy, I., Nickell, S., Tanaka, K., Saeki, Y., Forster, F., et al. (2012). Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 1479–1484.
- Sauna, Z.E., and Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 683–691.
- Schmidt, C., Kowalinski, E., Shanmuganathan, V., Defenouillère, Q., Braunger, K., Heuer, A., Pech, M., Namane, A., Berninghausen, O., Fromont-racine, M., et al. (2016). The cryo-EM structure of a ribosome–Ski2–Ski3–Ski8 helicase complex. *Science* *354*.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M.T., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 957–962.
- Seong, K.M., Jung, S.-O., Kim, H.D., Kim, H.J., Jung, Y.-J., Choi, S.-Y., and Kim, J. (2012). Yeast ribosomal protein S3 possesses a β -lyase activity on damaged DNA. *FEBS Lett.* *586*, 356–361.
- Sezen, B., Seedorf, M., and Schiebel, E. (2009). The SESA network links duplication of the yeast centrosome with the protein translation machinery. *Genes Dev.* *23*, 1559–1570.
- Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., and Hegde, R.S. (2016). Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes. *Cell* *167*, 1229–1240.e15.
- Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., et al. (2015). Rqc2 and 60S ribosomal subunits mediated mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* (80-.). *347*, 75–78.
- Shibata, N., Ohoka, N., Sugaki, Y., Onodera, C., Inoue, M., Sakuraba, Y., Takakura, D.,

- Hashii, N., Kawasaki, N., Gondo, Y., et al. (2015). Degradation of stop codon read-through mutant proteins via the ubiquitin-proteasome system causes hereditary disorders. *J. Biol. Chem.* 290, 28428–28437.
- Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., and Green, R. (2010). Dom34:Hbs1 Promotes Subunit Dissociation and Peptidyl-tRNA Drop-Off to Initiate No-Go Decay. *Science* 330, 369–372.
- Simms, C.L., Hudson, B.H., Rangwala, A.S., Zaher, H.S., and Mosior, J.W. (2014). An Active Role for the Ribosome in Determining the Fate of Oxidized mRNA Report An Active Role for the Ribosome in Determining the Fate of Oxidized mRNA. *CellReports* 1–9.
- Singh, R.K., Gonzalez, M., Kabbaj, M.-H.M., Gunjan, A., Ubc-myc-his, M.B.Y., and Hht, M.B.Y. (2012). Novel E3 ubiquitin ligases that regulate histone protein levels in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7, e36295.
- Sinturel, F., Navickas, A., Wery, M., Descrimes, M., Morillon, A., Torchet, C., and Benard, L. (2015). Cytoplasmic Control of Sense-Antisense mRNA Pairs. *Cell Rep.* 12, 1853–1864.
- Speth, C., and Laubinger, S. (2014). RACK1 and the microRNA pathway: is it déjà-vu all over again? *Plant Signal. Behav.* 9, e27909.
- Speth, C., Willing, E.-M., Rausch, S., Schneeberger, K., and Laubinger, S. (2013). RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 76, 433–445.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat. Methods* 10, 676–682.
- Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M.C., Satoh, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H., and Okada, Y. (1990). Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* 348, 73–76.
- Taylor, D.J., Devkota, B., Huang, A.D., Topf, M., Narayanan, E., Sali, A., Harvey, S.C., and Frank, J. (2009). Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. *Structure* 17, 1591–1604.
- Tenson, T., and Biology, C. (2002). Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel. *108*, 591–594.

- Thompson, M.K., Rojas-Duran, M.F., Gangaramani, P., and Gilbert, W. V (2016). The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *Elife* 5, 1–22.
- Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160, 823–831.
- Tsai, C.J., Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S. V., Gottesman, M.M., and Nussinov, R. (2008). Synonymous Mutations and Ribosome Stalling Can Lead to Altered Folding Pathways and Distinct Minima. *J. Mol. Biol.* 383, 281–291.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012). Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* 46, 518–529.
- Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J., and Deshaies, R.J. (2013). Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife* 2, e00308.
- Walker, S.E., Zhou, F., Mitchell, S.F., Larson, V.S., Valasek, L., Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R. (2013). Yeast eIF4B binds to the head of the 40S ribosomal subunit and promotes mRNA recruitment through its N-terminal and internal repeat domains. *RNA* 19, 191–207.
- Wolf, A.S., and Grayhack, E.J. (2015). Asc1 , homolog of human RACK1 , prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA* 1–11.
- Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol. Cell* 34, 191–200.
- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., and Kohno, K. (2011). Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science* 331, 586–589.
- Yonashiro, R., Tahara, E.B., Bengtson, M.H., Khokhrina, M., Lorenz, H., Chen, K.-C., Kigoshi-Tansho, Y., Savas, J.N., Yates, J.R., Kay, S.A., et al. (2016). The Rqc2/Tae2 subunit of the Ribosome-Associated Quality Control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation. *Elife* 5, 1–16.

表

表1 本研究に用いた出芽酵母株

Name	Genotype	Source
W303-1a	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Lab. Stock, Parent
<i>dom34Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2010
<i>asc1Δ</i>	<i>asc1Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2010
<i>ltn1Δ</i>	<i>ltn1Δ::kanMX4</i>	Matsuda <i>et al.</i> 2014
<i>nad2-1</i>	<i>nascent peptide dependent translation arrest defective 2-1, yDR266C' G532U'</i>	This study
<i>hel2(rqt1)Δ</i>	<i>hel2Δ::natMX4</i>	This study
<i>ubc4Δ</i>	<i>ubc4Δ::natMX4</i>	This study
<i>ubc5Δ</i>	<i>ubc5Δ::hygMX4</i>	This study
<i>upf1Δ</i>	<i>upf1Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2009
<i>ubr1Δ</i>	<i>ubr1Δ::natMX4</i>	This study
<i>dom34Δasc1Δ</i>	<i>asc1Δ::kanMX4, dom34Δ::hygMX4</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
<i>ltn1Δasc1Δ</i>	<i>ltn1Δ::kanMX4, asc1Δ::hygMX4</i>	Matsuda <i>et al.</i> 2014
<i>hel2(rqt1)Δltn1Δ</i>	<i>hel2Δ::natMX4, ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
<i>ski2Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2010
<i>ski2Δdom34Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX4, ski2Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2010
<i>ski2Δasc1Δ</i>	<i>ski2Δ::hygMX4, asc1Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2010
<i>ski2Δdom34Δasc1Δ</i>	<i>asc1Δ::kanMX4, dom34Δ::hygMX4, ski2Δ::natMX4</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
<i>ski2Δhel1Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, hel1Δ::natMX4</i>	This study
<i>ski2Δhel2Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, hel2Δ::natMX4</i>	This study
<i>ski2Δnot4Δ</i>	<i>not4Δ::kanMX4, ski2Δ::natMX4</i>	This study
<i>ski2Δltn1Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, ltn1Δ::hygMX4</i>	This study
<i>ski2Δubr1Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, ubr1Δ::natMX4</i>	This study
<i>ski2Δubc4Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, ubc4Δ::natMX4</i>	This study
<i>ski2Δubc5Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, ubc5Δ::hygMX4</i>	This study
<i>rps3ΔRPS3</i>	<i>rps3Δ::natMX4, p416GPDp-RPS3</i>	This study
<i>rps20ΔRPS20</i>	<i>rps20Δ::natMX4, p416GPDp-RPS20</i>	This study
<i>ski2Δrps3Δrps3-K212R rps20ΔRPS20</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, rps3Δ::natMX4, rps20Δ::hygMX4, p414GPDp-RPS3-K212R, p416GPDp-RPS20</i>	This study
<i>ski2Δasc1Δhel2Δ</i>	<i>ski2Δ::kanMX4, hel2Δ::natMX4, asc1Δ::hygMX4</i>	This study
<i>ski2Δdom34Δhel2Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX4, ski2Δ::kanMX4, hel2Δ::natMX4</i>	This study
<i>ski2Δdom34Δubc4Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX4, ski2Δ::kanMX4, ubc4Δ::natMX4</i>	This study
<i>xrn1Δ</i>	<i>xrn1Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> 2010
<i>xrn1Δdom34Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX4, xrn1Δ::kanMX4</i>	Tsuboi <i>et al.</i> 2012
<i>xrn1Δasc1Δ</i>	<i>xrn1Δ::kanMX4, asc1Δ::natMX4</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
<i>xrn1Δdom34Δasc1Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX4, xrn1Δ::kanMX4, asc1Δ::natMX4</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
<i>xrn1Δdom34Δhel2Δ</i>	<i>dom34Δ::hygMX4, xrn1Δ::kanMX4, hel2Δ::natMX4</i>	This study
<i>xrn1Δhel2Δ</i>	<i>xrn1Δ::kanMX4, hel2Δ::natMX4</i>	This study
<i>xrn1Δubc4Δ</i>	<i>xrn1Δ::kanMX4, ubc4Δ::natMX4</i>	This study
<i>xrn1Δslh1(rqt2)Δ</i>	<i>xrn1Δ::kanMX4, slh1Δ::natMX4</i>	This study
<i>ltn1Δrps20ΔRPS20</i>	<i>ltn1Δ::kanMX4, rps20Δ::natMX, p416GPDp-RPS20</i>	This study
<i>RPS20-3HA rqt1Δ</i>	<i>RPS20-3HA::HisMX6 rqt1Δ::natMX4</i>	This study
<i>rps20Δrqt1Δ</i>	<i>rps20Δ::natMX4, hel2Δ::kanMX4, p416GPDp-RPS20</i>	This study
<i>HEL2(RQT1)-FTP</i>	<i>HEL2-Flag-TEV-ProteinA:: natNT2</i>	This study
<i>NOT4-FTP</i>	<i>NOT4-Flag-TEV-ProteinA:: natNT2</i>	This study
<i>slh1(rqt2)Δ</i>	<i>slh1Δ::natMX4</i>	This study
<i>cue3(rqt3)Δ</i>	<i>cue3Δ::natMX4</i>	This study
<i>ykr023w(rqt4)Δ</i>	<i>ykr023wΔ::natMX4</i>	This study
<i>slh1(rqt2)Δltn1Δ</i>	<i>slh1Δ::natMX4, ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
<i>cue3(rqt3)Δltn1Δ</i>	<i>cue3Δ::natMX4, ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
<i>ykr023w(rqt4) ltn1Δ</i>	<i>ykr023wΔ::natMX4, ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
<i>slh1(rqt2)Δski2Δ</i>	<i>slh1Δ::natMX4, ski2Δ::kanMX4</i>	This study
<i>cue3(rqt3)Δski2Δ</i>	<i>cue3Δ::natMX4, ski2Δ::kanMX4</i>	This study
<i>ykr023w(rqt4)Δski2Δ</i>	<i>ykr023wΔ::natMX4, ski2Δ::kanMX4</i>	This study
<i>rqt3Δrqt4Δ</i>	<i>cue3Δ::kanMX4, ykr023wΔ::natMX4</i>	This study
<i>rqt3Δrqt4Δltn1Δ</i>	<i>cue3Δ::kanMX4, ykr023wΔ::natMX4, ltn1Δ::hygMX4</i>	This study

表2 本研究に用いたプラスミド

Plasmid No.	Plasmid	Source
p416GPDp	URA3 CEN6	Mumberg <i>et al.</i> 1995
p415GPDp	LEU2 CEN6	Mumberg <i>et al.</i> 1995
p414GPDp	TRP1 CEN6	Mumberg <i>et al.</i> 1995
p413GPDp	HIS3 CEN6	Mumberg <i>et al.</i> 1995
p416GALIp	URA3 CEN6	Mumberg <i>et al.</i> 1994
p413GALIp	HIS3 CEN6	Mumberg <i>et al.</i> 1994
p425GPDp	LEU2 2 μ	Mumberg <i>et al.</i> 1995
p424GALIp	TRP1 2 μ	Mumberg <i>et al.</i> 1994
YEplac112	TRP1 2 μ	Gietz and Sugino 1988
YEplac195	URA3 2 μ	Gietz and Sugino 1988
pAE14	p415GPDp-HEL2	This study
pAE29	p414GPDp-HBS1	Lab. Stock
pAG25	TEFp-natR-TEF1 (<i>nat</i> MX4)	Longtine <i>et al.</i> 1998
pAG32	TEFp-hygR-TEF1 (<i>hph</i> MX4)	Longtine <i>et al.</i> 1998
pDS1	p416GPDp-HA-GFP(K0)-FLAG-HIS3	This study
pDS2	p416GPDp-HA-GFP(K0)-GGN-FLAG-HIS3	This study
pDS3	p416GPDp-HA-GFP(K0)-R4a-FLAG-HIS3	This study
pDS6	p416GPDp-HA-GFP(K0)-K12-FLAG-HIS3	This study
pDS8	p416GPDp-HA-GFP(K0)-R12-FLAG-HIS3	This study
pDS9	p416GPDp-HA-GFP-FLAG-HIS3	This study
pDS10	p416GPDp-HA-GFP-R4a-FLAG-HIS3	This study
pDS11	p416GPDp-HA-GFP-R12-FLAG-HIS3	This study
pDS12	p416GPDp-HA-GFP-K12-FLAG-HIS3	This study
pDS13	p416GPDp-HA-GFP-GGN-FLAG-HIS3	This study
pEI28	p416GPDp-hsABCE1	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
pFA6a	TEFp-kanR-TEF1 (<i>kan</i> MX4)	Wach <i>et al.</i> 1998
pFS3	p415GPDp-RPL25-FLAG	Lab. Stock
pIT826	p416GALIp-FLAG-HIS3	Inada and Aiba 2005
pIT827	p416GALIp-FLAG-HIS3-NS	Inada and Aiba 2005
pIT912	p416GPDp-FLAG-HIS3	Inada and Aiba 2005
pKI11	p413GALIp-GFP-FLAG-HIS3	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
pKI12	p413GALIp-GFP-Rz-FLAG-HIS3	Ikeuchi <i>et al.</i> 2016
pKI18	p415HEL2p-HEL2	This study
pKI19	p415GPDp-HEL2-FLAG	This study
pKI21	p415GPDp-HEL2-HA	This study
pKI22	p415GPDp-HEL2-MYC	This study
pKI23	p414UBC4p-UBC4	This study
pKI26	p414GPDp-UBC4-HA	This study
pKI29	p415GPDp-HEL2 Δ RING	This study
pKI30	p415GPDp-HEL2 C64/67A	This study
pKI31	p415GPDp-HEL2 Δ RING-FLAG	This study
pKI32	p415GPDp-HEL2 C64/67A-FLAG	This study
pKI44	p416GPDp-RPS3	This study
pKI45	p416GPDp-RPS20	This study
pKI46	p414GPDp-RPS3	This study
pKI47	p414GPDp-RPS20	This study
pKI48	p413GPDp-GFP-R12-FLAG-HIS3	This study

pKI53	p414 <i>GPDp-RPS3 K212R</i>	This study
pKI66	p414 <i>GPDp-RPS3-HA</i>	This study
pKI67	p414 <i>GPDp-RPS20-HA</i>	This study
pKI74	p415 <i>GPDp-SKI2-CYCt</i>	Ikeuchi et al. 2016
pKI75	p415 <i>GPDp-SKI2 E445Q-CYCt</i>	Ikeuchi et al. 2016
pKI76	p416 <i>GPDp-HEL2</i>	This study
pKI80	p415 <i>GPDp-RPS20</i>	This study
pKI81	p415 <i>GPDp-RPS20 K8R</i>	This study
pKI82	p413 <i>GPDp-RPL25-FLAG</i>	This study
pKI83	p414 <i>GPDp-rps20-K6R/K8R</i>	This study
pKI84	p414 <i>GPDp-RPS20 22-121</i>	This study
pKI85	p415 <i>GPDp-rps20-K6R/K8R</i>	This study
pKI86	p415 <i>GPDp-rps20 22-121</i>	This study
pKI89	p415 <i>GPDp-HA-HEL2-CYCt</i>	This study
pKI90	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 ΔRING-CYCt</i>	This study
pKI91	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 C64/67A-CYCt</i>	This study
pKI92	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 1-539-CYCt</i>	This study
pKI93	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 1-439-CYCt</i>	This study
pKI94	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 1-315-CYCt</i>	This study
pKI95	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 1-215-CYCt</i>	This study
pKI99	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 61-539-CYCt</i>	This study
pKI100	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 61-439-CYCt</i>	This study
pKI101	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 61-315-CYCt</i>	This study
pKI102	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 316-539-CYCt</i>	This study
pKI144	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 1-248-CYCt</i>	This study
pKI145	p415 <i>GPDp-HA-HEL2 1-279-CYCt</i>	This study
pKI176	p414 <i>RPS20p-RPS20-HA-CYCt</i>	This study
pKI178	p414 <i>RPS20p-rps20-K6R/K8R-HA-CYCt</i>	This study
pKI179	p415 <i>GPDp-HA-hsZNF598-CYCt</i>	This study
pKI183	p415 <i>GPDp-HA-hsZNF598 Δ(1-20, 279-905)-CYCt</i>	This study
pKI190	p416 <i>GPDp-RPS2-FLAG-CYCt</i>	This study
pKI191	p416 <i>GPDp-RPL25-FLAG-CYCt</i>	This study
pKI203	p426 <i>GPDp-ProteinA-GFP-Rz-CYCt</i>	Ikeuchi et al. 2016
pKI220	p416 <i>GPDp-GFP-R(AGG)12-FLAG-HIS3-CYCt</i>	This study
pKI232	p416 <i>GPDp-GFP-(CGA-CUG)6-FLAG-HIS3-CYCt</i>	This study
pKI233	p416 <i>GPDp-GFP-(CGA-CCG)6-FLAG-HIS3-CYCt</i>	This study
pKI234	p416 <i>GPDp-GFP-(CGA-GCG)6-FLAG-HIS3-CYCt</i>	This study
pKK6	p416 <i>GPDp-GFP-FLAG-HIS3-K12</i>	Matsuda et al. 2014
pKK43	p424 <i>GAL1p-tUB6-3HA</i>	Kuroha et al. 2013
pKK64	p416 <i>CYC1p-GFP-R12-FLAG-HIS3</i>	Kuroha et al. 2010
pKK103	p416 <i>GAL1p-FLAG-HIS3-100</i>	Kuroha et al. 2009
pKK119	p415 <i>GPDp-hsPELO</i>	Ikeuchi et al. 2016
pKK146	p415 <i>GPDp-DOM34</i>	Ikeuchi et al. 2016
pKK169	p416 <i>GPDp-FLAG-ASC1</i>	Ikeuchi et al. 2016
pKK181	p415 <i>GPDp-FLAG-ASC1 R38D K40E</i>	Kuroha et al. 2010
pKK184	p415 <i>GPDp-FLAG-ASC1 D109Y</i>	Kuroha et al. 2010
pKK225	YEplac112- <i>CUP1-MYC-UBI-CYCt</i>	Lab. Stock
pKK298	p416 <i>GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3</i>	Tsuboi et al. 2012
pKK321	p416 <i>GPDp-GFP-R4a-FLAG-HIS3</i>	Tsuboi et al. 2012
pKW21	p414 <i>GPDp-RPL25-FLAG</i>	Lab. Stock

pKW31	p415 GPDp-PELO Δ LoopC	Ikeuchi et al. 2016
pKW41	p415 TEF2p-PELO	Ikeuchi et al. 2016
pKW42	p415 ADH1p-PELO	Ikeuchi et al. 2016
pKW43	p415 CYC1p-PELO	Ikeuchi et al. 2016
pLD1	p416 GPDp-GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3	Dimitrova et al. 2009
pLD3	p416 GPDp-GFP-R12-FLAG-HIS3	Dimitrova et al. 2009
pLD6	p416 GPDp-GFP-SL-FLAG-HIS3	Dimitrova et al. 2009
pLD37	p416 GAL1p-GFP-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pMA18	p415 GPDp-FLAG-ASC1	Ikeuchi et al. 2016
pMA19	p415 GPDp-FLAG-ASC1 16HNG18AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA20	p415 GPDp-FLAG-ASC1 38RDK40AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA21	p415 GPDp-FLAG-ASC1 65SHI67AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA22	p415 GPDp-FLAG-ASC1 85WDK87AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA23	p415 GPDp-FLAG-ASC1 106HKS108AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA24	p415 GPDp-FLAG-ASC1 127RDK129AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA25	p415 GPDp-FLAG-ASC1 148NDW150AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA26	p415 GPDp-FLAG-ASC1 195HNS197AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA27	p415 GPDp-FLAG-ASC1 216KDG218AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA28	p415 GPDp-FLAG-ASC1 236AQD238AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA29	p415 GPDp-FLAG-ASC1 257ATG259AAA	Ikeuchi et al. 2016
pMA30	p415 GPDp-FLAG-ASC1 175DKM177AAA	Ikeuchi et al. 2016
pEI 024	p413 GPDp-GFP-Rz	Ikeuchi et al. 2016
pME2	p414 GPDp-HBS1L	Ikeuchi et al. 2016
pEI21	p413 GPDp-ABCE1	Ikeuchi et al. 2016
pME 019	p415 GPDp-PELO-FLAG	Ikeuchi et al. 2016
pME47	p415 GPDp-PELO K2A	Ikeuchi et al. 2016
pME48	p415 GPDp-PELO R45A	Ikeuchi et al. 2016
pME50	p415 GPDp-PELO D(R45-T60)	Ikeuchi et al. 2016
pME 049	p415 GPDp-PELO R45A-FLAG	Ikeuchi et al. 2016
pME2	p414 GPDp-hsHBS1	Ikeuchi et al. 2016
pME44	p416 GALp-GFP-Rz-FLAG-HIS3	Tsuboi et al. 2012
pMK88	pYO323(2 μ , HIS3)-CUP1p-MYC-UBI-CYC1t	Fujii et al. 2009
pSA144	p416 GPDp-GFP-FLAG-HIS3	Dimitrova et al. 2009
pSA157	p416 GPDp-GFP-FLAG-HIS3-NS	Matsuda et al. 2014
pTS153	p416 GAL1p-GFP-GGN12-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pTS154	p416 GAL1p-GFP-SL-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pTS155	p416 GAL1p-GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pTS196	p416 GAL1p-GFP-R4a-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pTT39	p416 GPDp-FLAG-HIS3-100	Kuroha et al. 2009
pTT186	p416 GPDp-GFP-GGN12-FLAG-HIS3	Tsuboi et al. 2012
pTT298	p416 GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3	Tsuboi et al. 2012
pTT321	p416 GPDp-GFP-R4a-FLAG-HIS3	Dimitrova et al. 2009
pYE10	p413 GPDp-GFP-GGN12-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pYE11	p413 GPDp-GFP-SL-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pYE12	p413 GPDp-GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pYE13	p413 GPDp-GFP-R4a-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pYE14	p413 GPDp-GFP-FLAG-HIS3	Lab. Stock
pYE15	p413 GPDp-ABCE1	This study



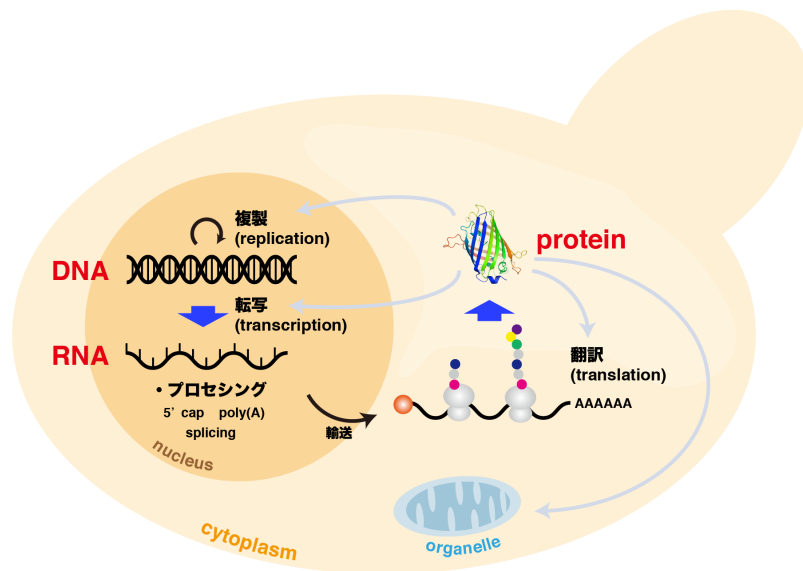


図 1-1 セントラルドグマ

DNA がコードする遺伝情報は細胞分裂の際には複製され、遺伝子発現時には RNA に転写される。転写されてできた前駆体 RNA は核内での mRNA 成熟化過程を経て細胞質や輸送される。mRNA が持つ遺伝情報は細胞質でリボソーム (灰色) によって読み取られ、タンパク質へと変換される。発現したタンパク質が細胞内外の様々な場所で様々な機能を発揮することで、遺伝子発現、細胞の恒常性の維持、細胞応答などに寄与している。

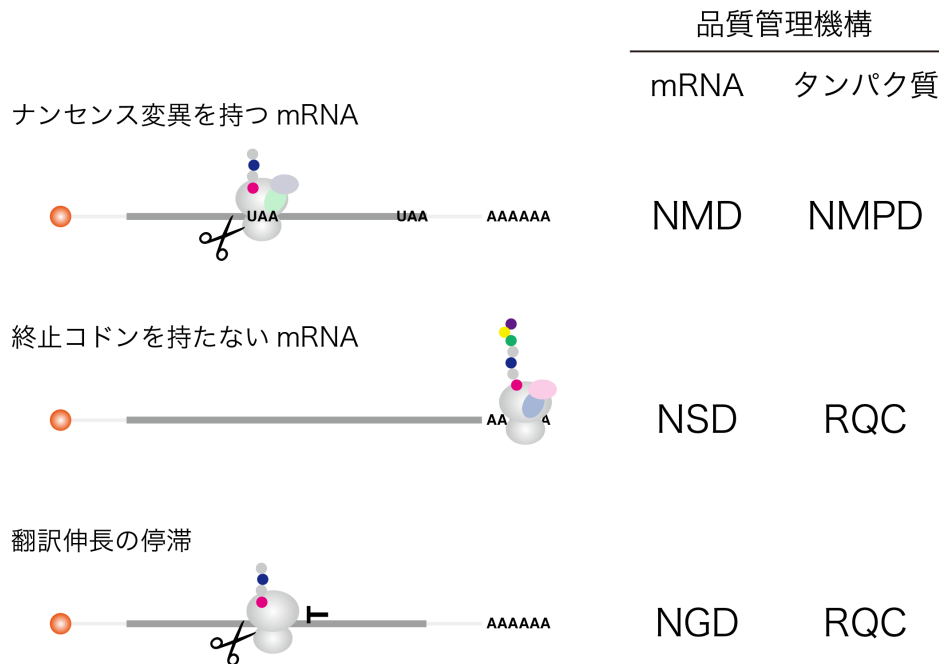


図 1-2 異常翻訳に共役した mRNA-タンパク質品質管理機構

(上段) ナンセンス変異を持つ mRNA は ORF の途中で翻訳終結を生じる。これを異常と識別し、mRNA を分解する機構を NMD という。本機構は mRNA の分子内切断を伴う。同時に、通常よりも短い異常タンパク質は NMPD によって分解される。≡: エンドヌクレアーゼ。(中段) 終止コドンを持たない mRNA では、リボソームがポリ A 鎖もしくは mRNA の 3' 末端まで翻訳してしまうが、これを異常と識別し、mRNA を分解する機構を NSD という。また、タンパク質は RQC 機構によって分解される。(下段) mRNA の配列もしくは細胞内環境によって、リボソームが翻訳伸長途中に停滞した場合、これを異常と識別し、mRNA を分解する機構を NGD という。また途中まで合成された短鎖型の新生ポリペプチド鎖は RQC 機構によって分解される。

NMD

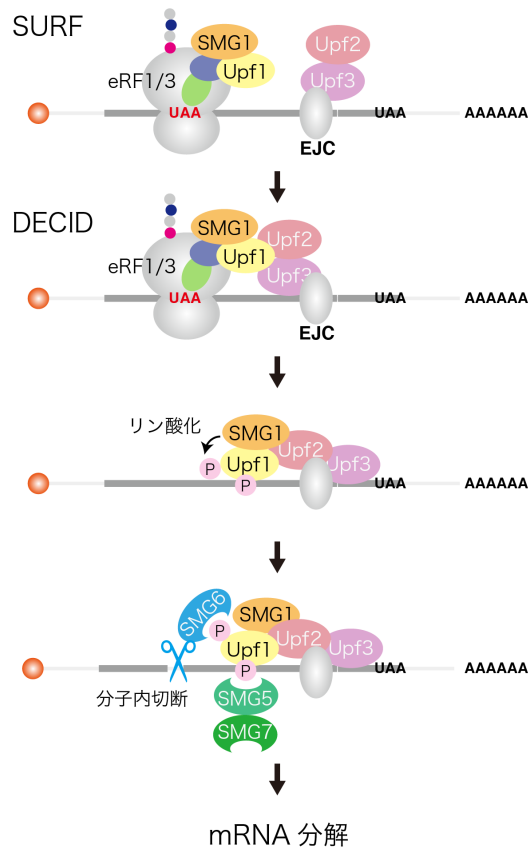


図 1-3 Nonsense-mediated mRNA decay の EJC モデル

リボソームが未成熟終止コドン（赤色）で翻訳終結反応を起こした際に、下流に EJC が存在すると、リボソーム上に Upf1 および SMG1 がリクルートされ、SURF 複合体を形成する。その後、EJC 上の Upf2-3 と相互作用し、DECID 複合体を形成した後、SMG1 による Upf1 のリン酸化およびリボソームの解離が生じる。リン酸化された Upf1 に NMD 因子の SMG6 が結合し、PIN ドメインを介して mRNA の分子内切断が生じる。また、SMG5-7 がリン酸化 Upf1 に結合し mRNA 分解を誘導する。

NMD

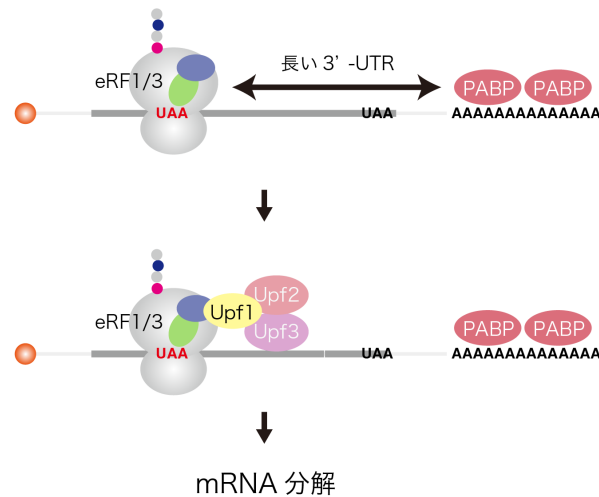


図 1-4 Nonsense-mediated mRNA decay の faux 3' -UTR モデル

リボソームが未成熟終止コドン (赤色) で翻訳終結反応を起こした際に、下流に EJC が存在しない場合においても、NMD が惹起される場合がある。通常の翻訳終結では eRF3 と PABP もしくは 3' -UTP に結合する RNA 結合タンパク質との距離が近く相互作用しやすいため、効率的に翻訳終結が進行する。しかし、未成熟終止コドンで翻訳終結した場合 eRF3 と PABP や RNA 結合タンパク質との距離が遠く相互作用しづらい。このような場合に Upf1-2-3 が異常翻訳終結と認識し、eRF1/3 と相互作用することで、NMD が惹起される。なお、本モデル図では、mRNA を 1 本差で表記しているが、実際には Cap 結合タンパク質 CBP と PABP は相互作用しており、環状構造 closed-loop 構造を形成している。

NSD

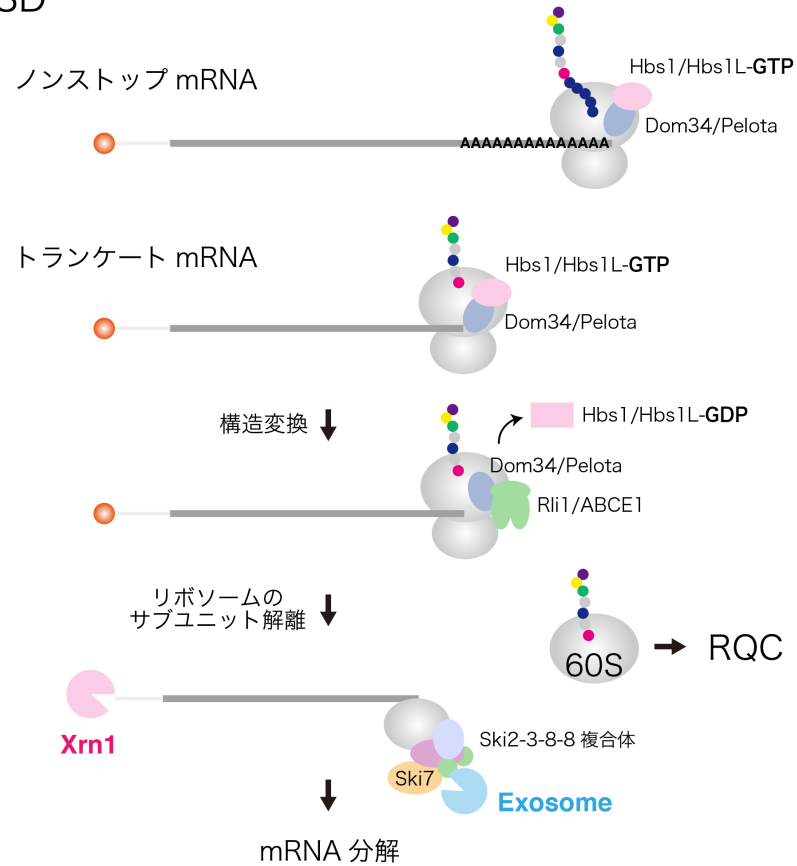


図 1-5 Nonstop mRNA decay のモデル

ノンストップ mRNA の末端もしくはトランケート mRNA の 3' 末端までリボソームが翻訳すると、末端で停滞したリボソームの空の A サイトを認識して Dom34/Pelota-Hbs1/Hbs1L が結合する。Hbs1 の GTP 加水分解能により Dom34 の構造変換が生じたのち、Rli1/ABCE1 がリボソームに結合し、NTPase 依存的にリボソームのサブユニット解離を行なう。Ski2-3-8-8 複合体、Ski7 が mRNA もしくはリボソームに結合し、リクルートされた Exosome が 3'→5' 方向に mRNA を分解する。またノンストップ mRNA では、PABP が外れることにより closed-loop 構造が壊れるため、Xrn1 依存的な 5'→3' 方向の分解も促進される。トランケート mRNA の場合は環状構造を形成できないため、NSD の有無にかかわらず Xrn1 依存的な 5'→3' 方向の分解を受ける。

NGD

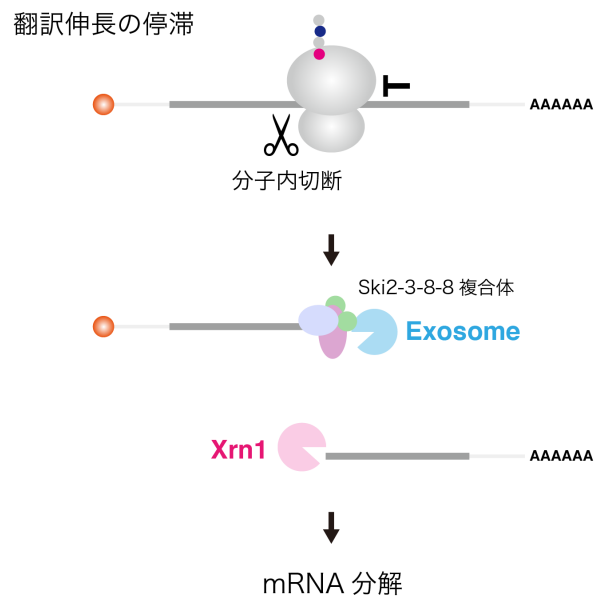
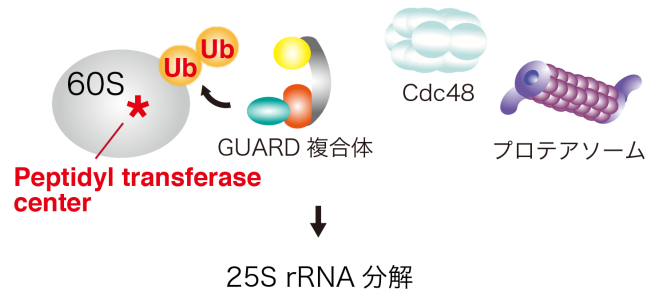


図 1-6 No-go decay のモデル

リボソームが mRNA の強固な二次構造やレアコドンクラスター、ポリ A 配列等の特殊配列を翻訳すると、翻訳伸長反応の停滞が生じる。リボソームが停滞すると、停滞したリボソームの近傍で mRNA が未知のエンドヌクレアーゼにより分子内切断を受ける。切断されてできた 5' 側中間産物と 3' 側中間産物はそれぞれ Exosome および Xrn1 エキソヌクレアーゼにより迅速に分解される。5' 側中間産物上には、後続のリボソームが存在すると考えられ、このようなリボソームは 5' 側中間産物の 3' 末端で停滞し、Dom34/Pelota-Hbs1/Hbs1L 依存的にサブユニット解離することで NSD 経路による分解が進行する。

25S NRD



18S NRD

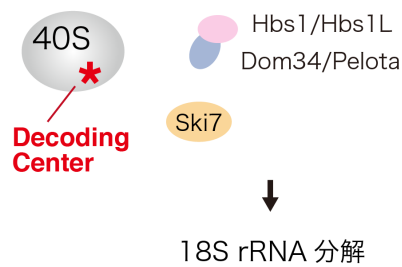


図 1-7 Nonfunctional rRNA decay のモデル

リボソームの各サブユニットの構成 rRNA の活性中心に変異を持つような rRNA は、翻訳依存的に異常が認識され分解される。60S サブユニットの 25S rRNA の場合、ペプチド鎖転移活性中心 (PTC; peptidyl transferase center) に変異を持つ rRNA を含むリボソームは、翻訳開始直後に翻訳伸長停滞を引き起こすと考えられる。E3 ユビキチン化酵素複合体 GUARD によるリボソームユビキチン化が 25S rRNA 分解に必須である。また、分解には Cdc48 複合体およびプロテアソーム活性が必須である。40S サブユニットの 18S rRNA の場合、コドン解読領域 (DC; decoding center) に変異を持つ rRNA を含むリボソームは同様に翻訳伸長停滞を引き起こすと考えられる。18S rRNA 分解には NSD 因子である Dom34/Pelota-Hbs1/Hbs1L および Ski7 が関与することがわかっており、翻訳依存的分解系は、停滞したリボソームの解消機構と同様の経路を経ると考えられている。

NMPD

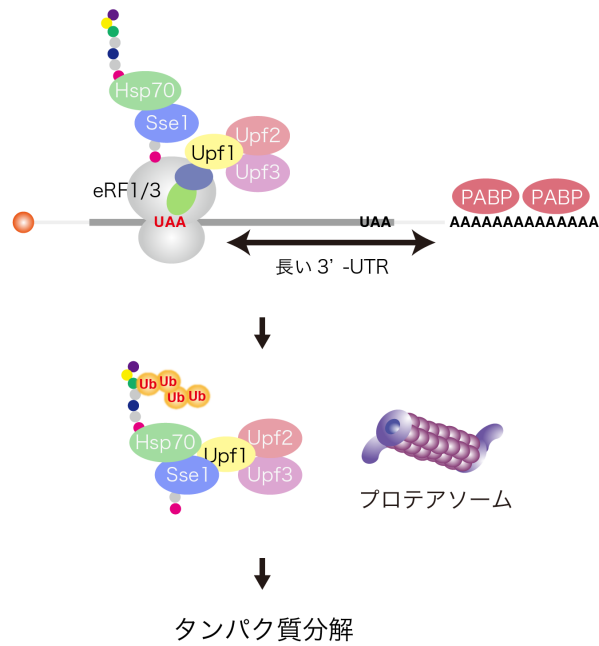


図 1-8 Nonsense-mediated protein degradation のモデル

NMD の基質 mRNA の翻訳によって産生されたタンパク質は、完全長でないためフォールディング異常を生じる場合がある。このようなタンパク質は NMD 因子 Upf1-2-3 およびシャペロン分子 Hsp70 および Sse1 によって認識され、ユビキチンプロテアソーム系によって分解される。本機構は出芽酵母に存在するが、哺乳動物細胞では確認されていない。

RQC

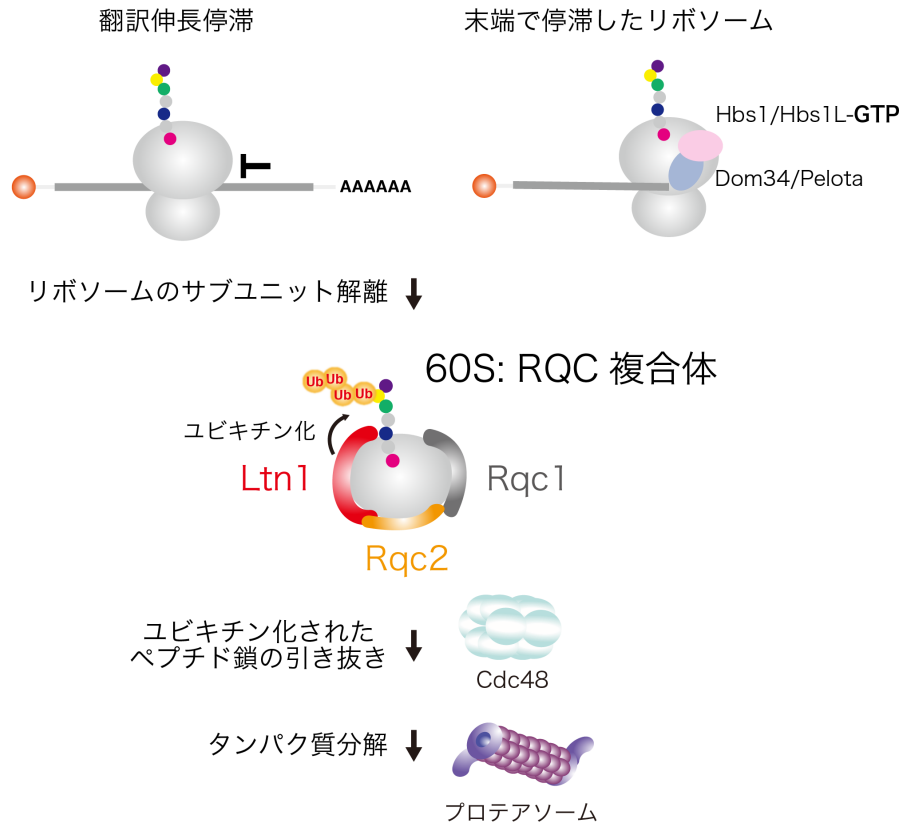


図 1-9 Ribosome-associated quality control のモデル

NSD や NGD の基質 mRNA 上で停滞したリボソームは異常な新生ペプチド鎖を保持しており、リボソーム解離後も 60S サブユニットにペプチジル tRNA として保持される。Rqc1-Rqc2-Ltn1 がこのような 60S を認識して結合することで RQC 複合体が形成される。RQC 複合体上で Ltn1 が新生鎖をユビキチン化し、Cdc48 複合体がこれを引き抜く。最終的にユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。

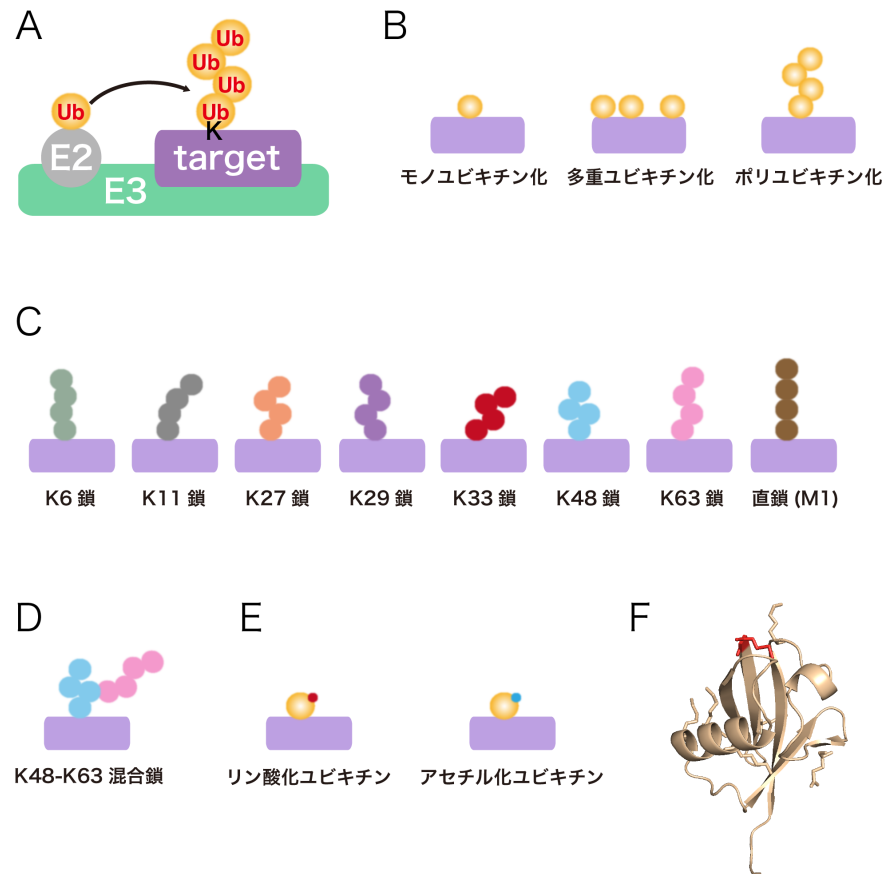


図 1-10 ユビキチン化の多様性

(A) E3 ユビキチンリガーゼは標的分子および E2 ユビキチン結合酵素と結合し、ユビキチンを基質のリジン残基に付加する酵素である。(B) ユビキチン化の様式の模式図。(C) ポリユビキチン鎖の多様性。(D) K48 鎖および K63 鎖のユビキチン混合鎖は NF- κ B シグナリングに関与する。(E) ユビキチン自身の翻訳後修飾によって、ユビキチン化の多様性はさらに広がった。(F) ユビキチンの X 線結晶構造。PDB: 1UBQ より引用改変。図の作製には Mac PyMol (www.pymol.org) を使用した。

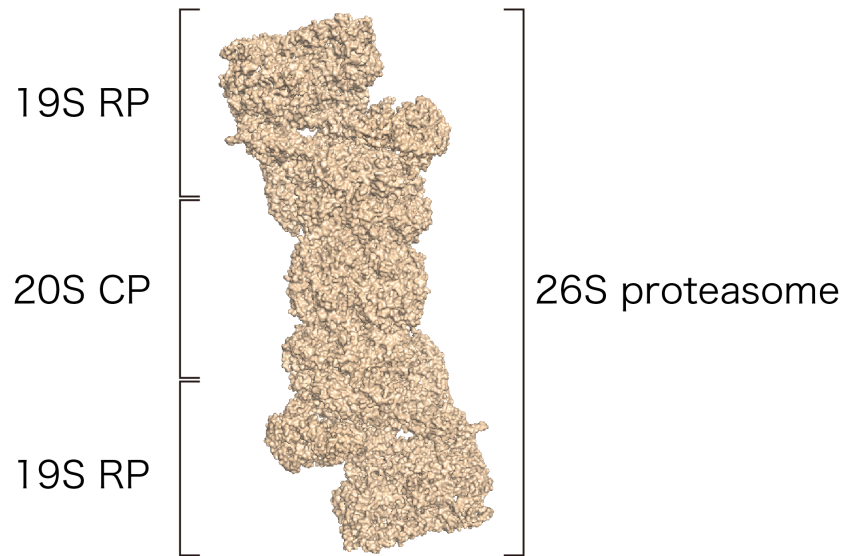


図 1-11 26S プロテアソームの極低温電子顕微鏡構造

26S プロテアソームは細胞内複合体の中で最も巨大である。ユビキチン結合ドメイン Rpn10、Rpn13 および脱ユビキチン化酵素 Rpn11 を有する、2 つの 19S サブユニットと、タンパク分解活性をもつ β 1、 β 2、 β 5 を有する 20S コアサブユニットからなる。構造は PDB: 5GJR から引用改変、図の編集には PyMol(www.pymol.org) を使用した。

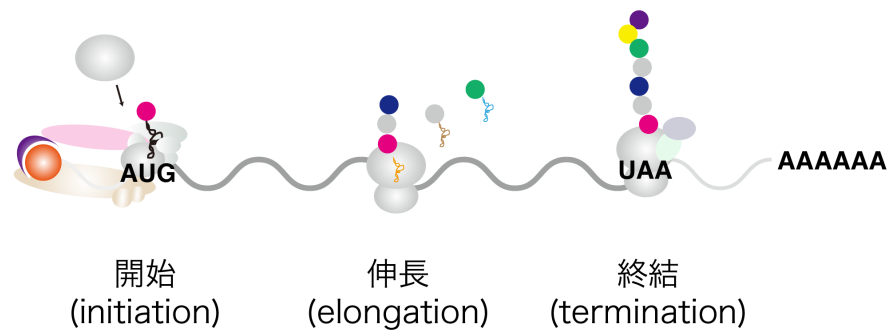


図 1-12 真核生物における翻訳のプロセス

翻訳は大きく分けて 3 つのステップによって行われる。mRNA 上の開始コドン进行スキャンし、タンパク質の読み枠を探す翻訳開始反応、mRNA にコードされた情報 (コドン) をアミノアシル tRNA が読みとって、ペプチド鎖形成を繰り返していく翻訳伸長反応、終止コドンにおいて、合成したペプチド鎖のリリースとリボソームのサブユニット解離を行なう翻訳終結反応に大別される。

RQC

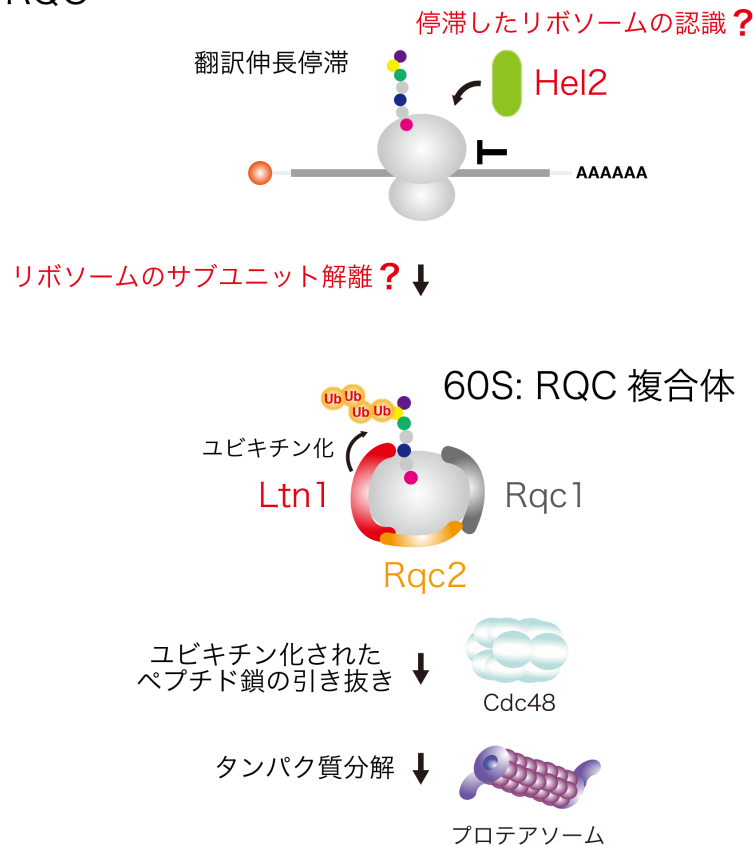


図 2-1 現在までに明らかにされている翻訳伸長停滞に起因する RQC 機構と問題点

翻訳停滞したリボソームは未知の機構によって認識され、サブユニット解離が行われる。リボソーム解離後の 60S サブユニットに Rqc1-Rqc2-Ltn1 が結合することで RQC 複合体が形成される。RQC 複合体上で Ltn1 が新生鎖をユビキチン化し、Cdc48 複合体がこれを引き抜き、最終的にユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。本機構においては、トリガーとなる停滞したリボソームの認識機構、およびリボソームのサブユニット解離機構が未だ解明されていない。本研究では翻訳伸長停滞に関与する因子として同定した E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 がこれらの機構に関与する分子であると想定し解析を行なった。

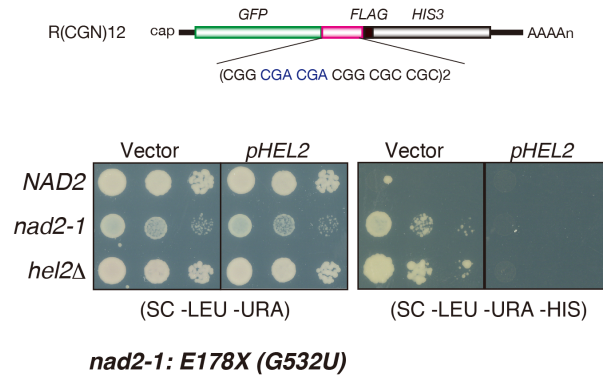


図 2-2 Nad2/Hel2 の同定

(A) 解析およびスクリーニングに用いたレポーター mRNA の模式図。R(CGN)12 レポーターは翻訳伸長停滞配列 CGA-CGA を含む。(B) *nad2-1* 変異株は *HEL2* 遺伝子に変異を有する。野生株 (*NAD2*), *nad2-1* 変異株および *hel2Δ* 株に p416CYC1p-GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3 レポーターおよび空ベクターまた p415HEL2p-HEL2 を導入した株に関して、スポットアッセイを行なった。本実験に使用した酵母株は *HIS3* 遺伝子が欠失しており、ヒスチジン欠損培地では通常生育できないが、*nad2-1* 変異株および *hel2Δ* 株では p416CYC1p-GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3 レポーター由来の His3 タンパク質が発現し、ヒスチジン欠損培地で生育できる。しかし、*nad2-1* 変異株に *Hel2* 発現プラスミド (p415HEL2p-HEL2) を導入した株では、ヒスチジン欠損培地で生育しなかった。すなわち *nad2-1* 変異株は *HEL2* 遺伝子にのみ変異を持つ。また、*nad2-1* 変異株の *HEL2* 遺伝子に関して PCR 法による増幅後、シーケンス解析を行なったところ、532 番目のグアニンがチミジン (ウラシル) に変異することでナンセンス変異が生じていた。

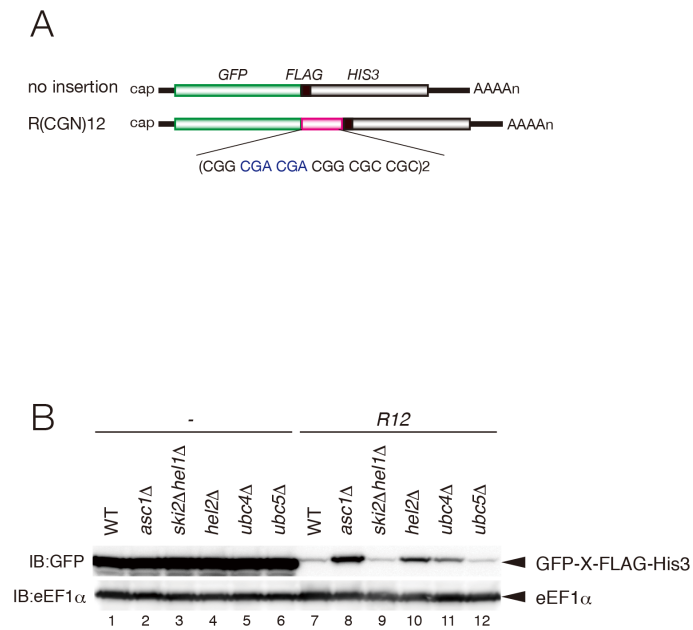


図 2-3 *hel2* 欠損株では翻訳停滞配列であるレアコドンクラスター下流の翻訳が増加する

(A) 解析に用いたレポーター mRNA の模式図。R(CGN)12 レポーターは翻訳伸長停滞配列 CGA-CGA を含む。
 (B) *hel2*Δ 株および *ubc4*Δ 株は *asc1*Δ 株と同様に、翻訳停滞配列の翻訳が上昇する。R(CGN)12 レポーターを発現させた表記の変異株のライセートからタンパク質サンプルを調製し、ウェスタンブロッティング法を用いて GFP-R12-FLAG-His3 およびローディングコントロールの eEF1α の検出を行なった。

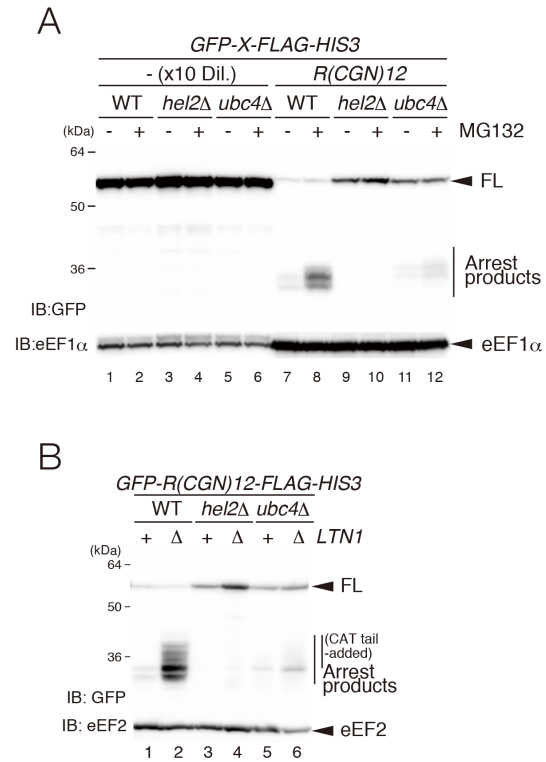


図 2-4 Hel2:Ubc4 は連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳アレスト産物の分解に必須である

(A) *hel2Δ* 変異株および *ubc4Δ* 変異株は翻訳アレスト産物の分解に欠損を示す。R12 レポーターを発現させた野生株、*hel2Δ* 変異株および *ubc4Δ* 変異株について、培養時に DMSO またはプロテアソーム阻害剤 MG132 処理を行ない、タンパク質を精製し、ウェスタンブロッティング法を用いて GFP および eEF1α の検出を行なった。

(B) Hel2 は Ltn1 依存的な翻訳アレスト産物の分解に必須である。R12 レポーターを発現させた表記の変異株からタンパク質サンプルを精製し、ウェスタンブロッティング法を用いて GFP の検出を行なった。

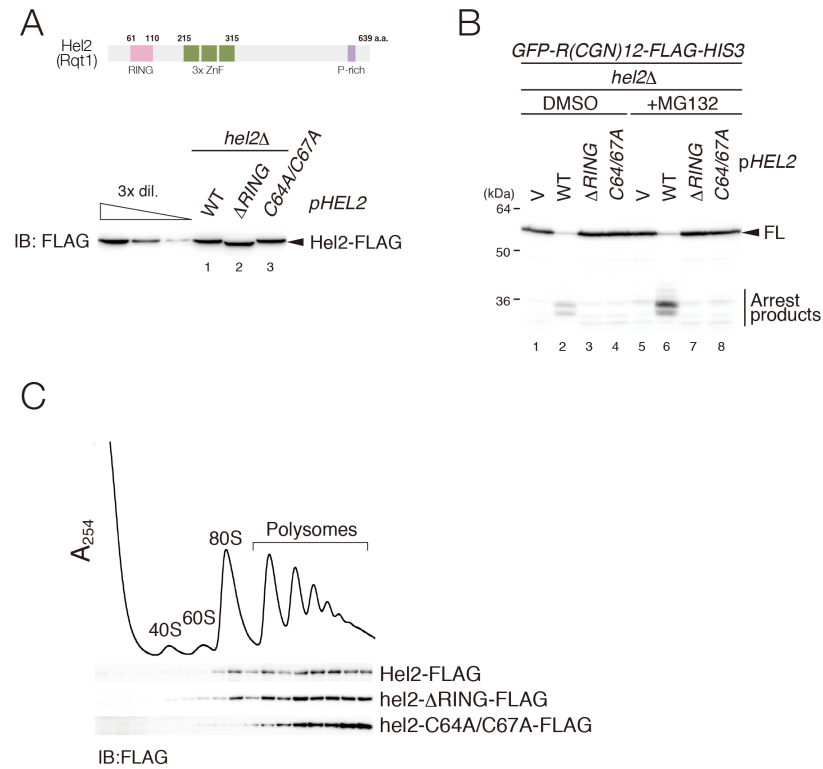


図 2-5 Hel2 ユビキチン化活性が翻訳伸長停滞によって起こる RQC に必須である

(A) *hel2Δ* 変異株に野生型および変異型の Hel2 を発現させた株からタンパク質サンプルを調整し、Hel2 の発現量をウエスタンブロットングにより確認した。(B) R12 レポーターおよび野生型または変異型の Hel2 を発現させた発現させた *hel2Δ* 変異株について、培養時に DMSO またはプロテアソーム阻害剤 MG132 処理を 2 時間行ない、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットング法を行なった。

(C) Hel2 ポリソーム画分に分布する。*hel2Δ* 変異株に野生型および変異型の Hel2 を発現させた株由来のライセートをショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析により画分に分け、各フラクションのタンパク質サンプルを調製し、ウエスタンブロットング法を用いて Hel2 の検出を行なった。

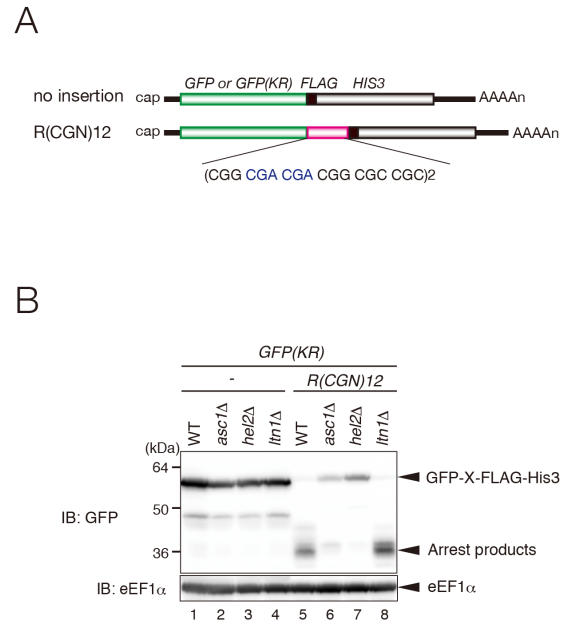


図 2-6 新生ペプチド鎖のユビキチン化は RQC の惹起に必要でない

(A) 解析に用いたレポーター mRNA の模式図。GFP または GFP のリジン残基を全てアルギニン残基に置換した GFP(KR) を含む GFP-FLAG-HIS3、R(CGN)12 のレポーターを用いて解析を行なった。GFP(KR) 由来の GFP(KR) タンパク質はユビキチン化を受けないと考えられる。

(B) 5' 末端に HA タグ配列を付加した GFP または GFP(KR) を含む GFP-FLAG-HIS3、R12 を用いて野生株および *asc1Δ*、*hel2Δ*、*ltn1Δ* 各株を形質転換し、タンパク質を精製後、抗 GFP 抗体および抗 eEF1 α 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった。

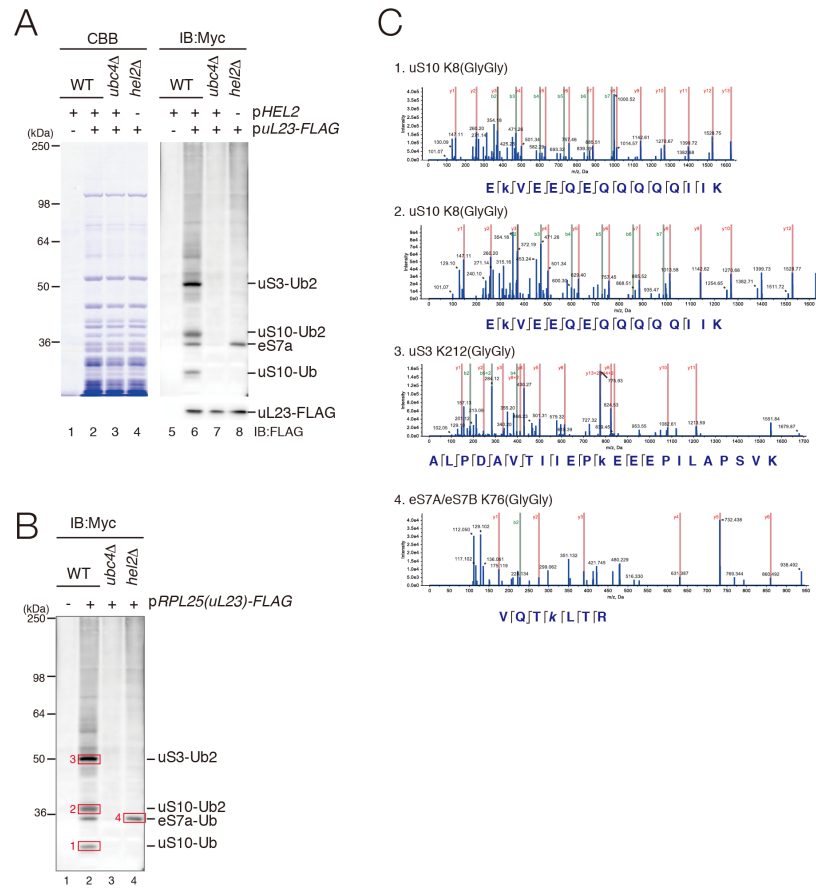


図 2-7 Hel2 は Rps3 および Rps20 をユビキチン化する

(A) 表記の株に Rpl25-FLAG, Hel2, Myc-Ub を発現するプラスミドを導入した株からライセートを調整し、抗 FLAG ビーズを用いて、リボソームを精製した。精製サンプルを PAGE-CBB 染色またはウェスタンブロッティング法を用いてユビキチン化タンパク質を抗 Myc 抗体により検出した。(B) (A) の図に対し、質量分析を行なったタンパク質サンプルを示した。(C) LC-MS/MS 解析の結果、検出されたグリシングリシン化ペプチドのイオン開裂パターンを示した。

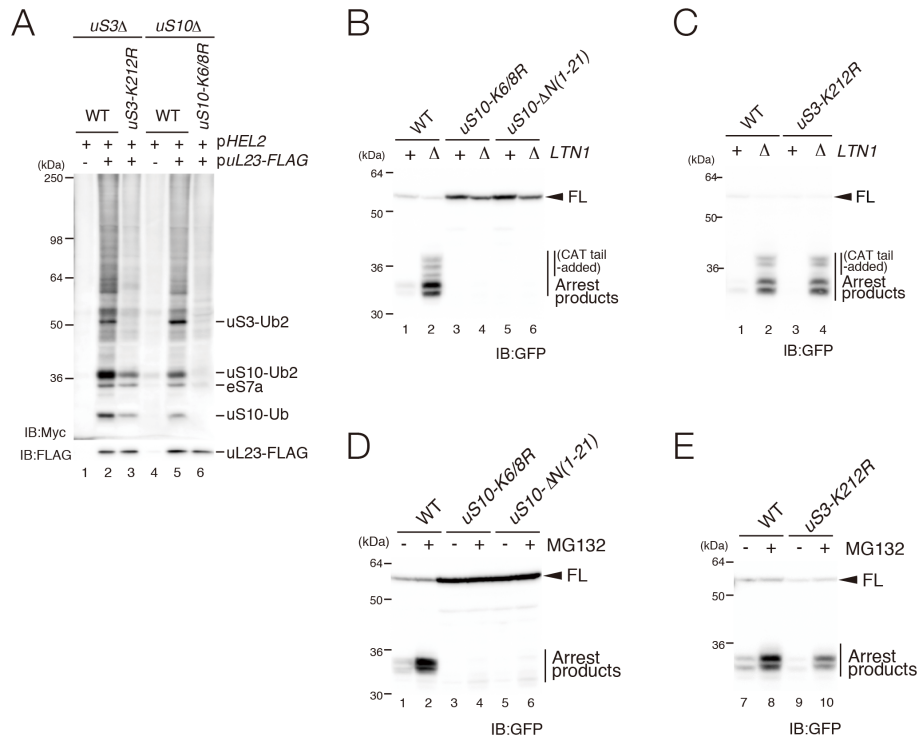


図 2-8 Hel2 による Rps20 のユビキチンが翻訳伸長停滞によって起こる RQC に必須である

(A) 表記の株に Rpl25-FLAG, Hel2, Myc-Ub を発現するプラスミドを導入した株からライセートを調整し、抗 FLAG ビーズを用いてリソソームを精製した。精製サンプルに関して、ウエスタンブロッティング法を用いてユビキチン化タンパク質は抗 Myc 抗体を、精製した Rpl25(uL23)-FLAG は抗 FLAG 抗体を用いて検出した。(B-C) 表記の変異株に *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* レポーターを導入した株からタンパク質サンプルを調整し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行なった。(D-E) 表記の変異株に *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* レポーターを導入した株について、培養時に DMSO またはプロテアソーム阻害剤 MG132 処理を 2 時間行ない、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法を行なった。

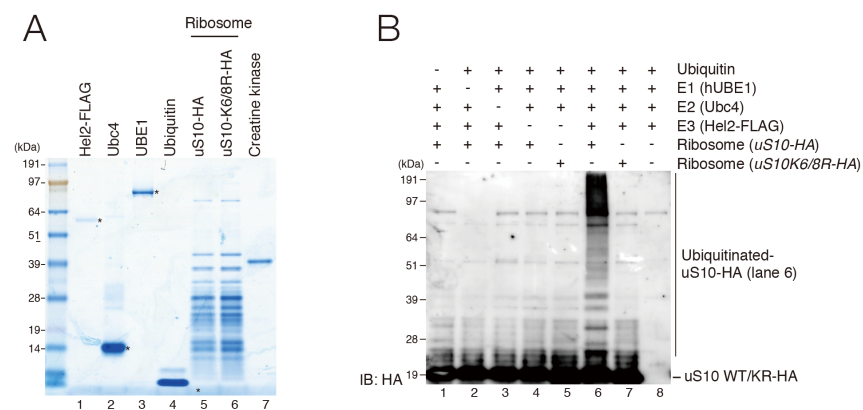


図 2-9 Hel2 は直接 Rps20 のユビキチン化を行なう

(A) *in vitro* ユビキチン化反応に用いた酵素、基質およびユビキチンに関して、PAGE-CBB 染色による品質確認を行なった。(B) *in vitro* ユビキチン化反応を 26°C で 20 分間行なった後、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングによりユビキチン化された Rps20 の検出を行なった。

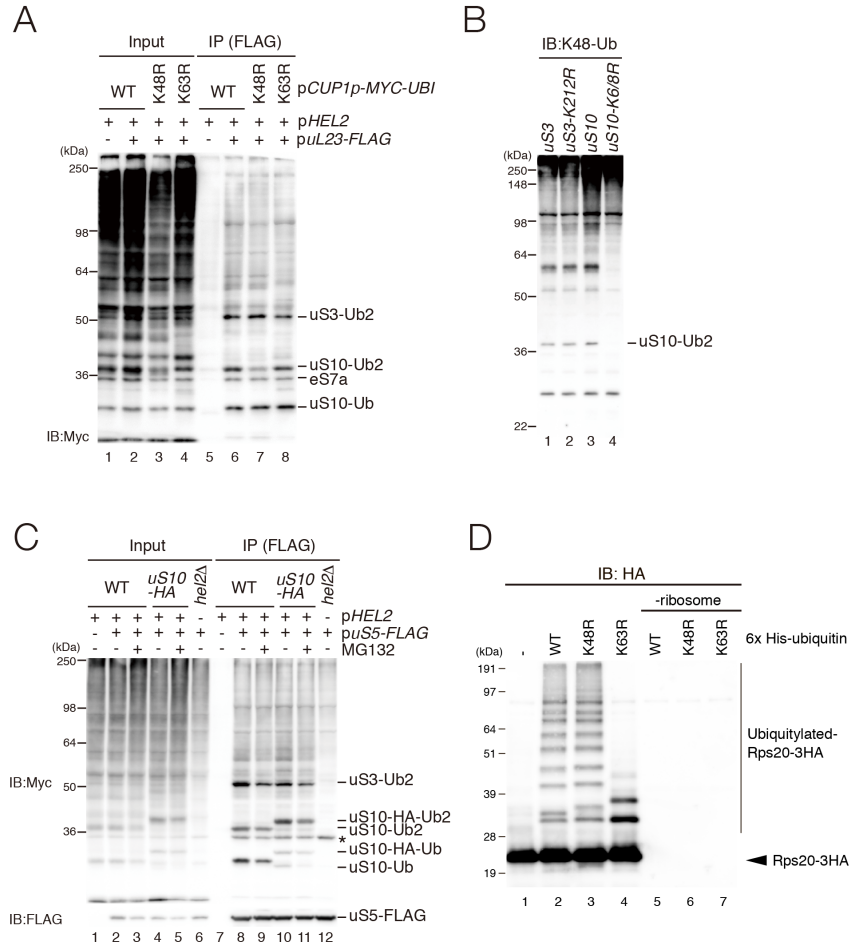


図 2-10 Rps20 のユビキチン化様式の解析。

(A) 野生株に Rpl25-FLAG, Hel2, Myc-Ub 野生型もしくは KR 変異体を発現するプラスミドを導入し、ライセートを調整後、抗 FLAG ビーズを用いてリボソームを精製した。(B) 表記の株に Rpl25-FLAG, Hel2 を発現するプラスミドを導入し、ライセートを調整後、抗 FLAG ビーズを用いてリボソームを精製した。(C) 表記の株に Rps2-FLAG, Hel2, Myc-Ub を発現するプラスミドを導入し、培養時に DMSO または MG132 処理を 2 時間行なった。ライセートを調整後、抗 FLAG ビーズを用いてリボソームを精製した。(A-C) 精製サンプルに関して、ウエスタンブロッティング法をにより、ユビキチン化タンパク質は抗 Myc 抗体を、K48-ユビキチン鎖は抗 K48-Ub 抗体を、精製した Rps2(uS5)-FLAG は抗 FLAG 抗体を用いて検出した。(D) 表記のユビキチンの変異体を用いて、Hel2 によるリボソームユビキチン化の *in vitro* 反応を 26°C で 15 分間行なった後、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりユビキチン化された Rps20 の検出を行なった。

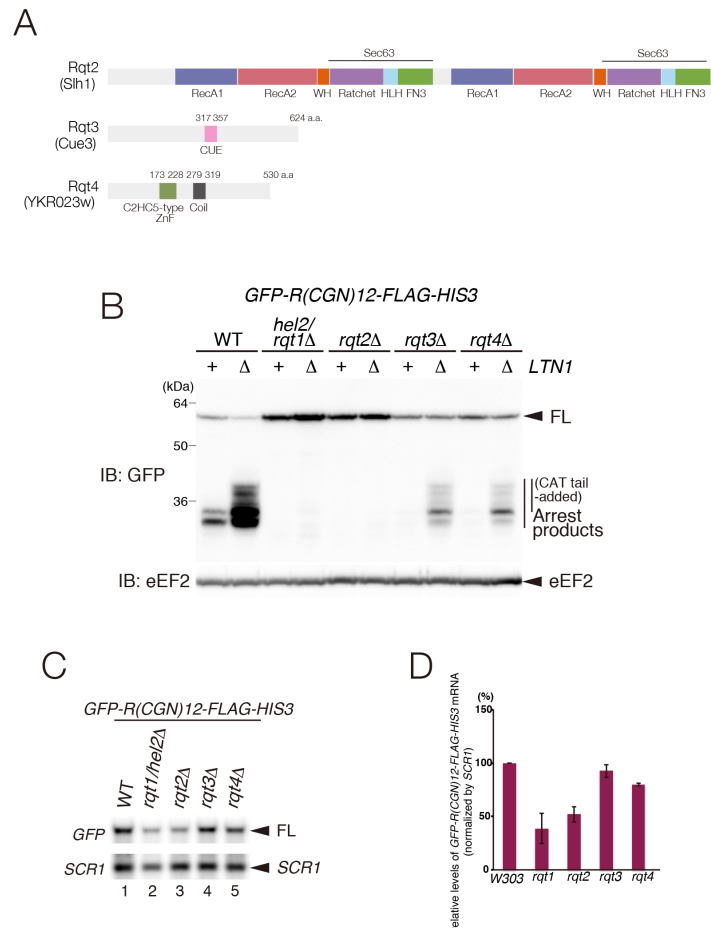


図 2-11 Rqt2-3-4 は RQC に必須な新規品質管理因子である。

(A) Rqt2-3-4 のドメイン構成の模式図。RecA1/A2: Rec ヘリカーゼ様ドメイン、Sec63: Sec63 様ドメイン、ZnF: zinc-finger ドメイン。(B) R(CGN)12 レポーターを発現する表記の株に関して、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットングにより全長 (FL) もしくはアレスト産物の検出を行った。ローディングコントロールとして eEF2 を検出した。(C-D) R(CGN)12 レポーターを発現する表記の株由来の Total RNA サンプルに関して、表記のプロンプを用いたノーザンブロットングを行ない、全長およびローディングコントロール (*SCR1*) の検出 (C) および、定量解析 (D) を行った。

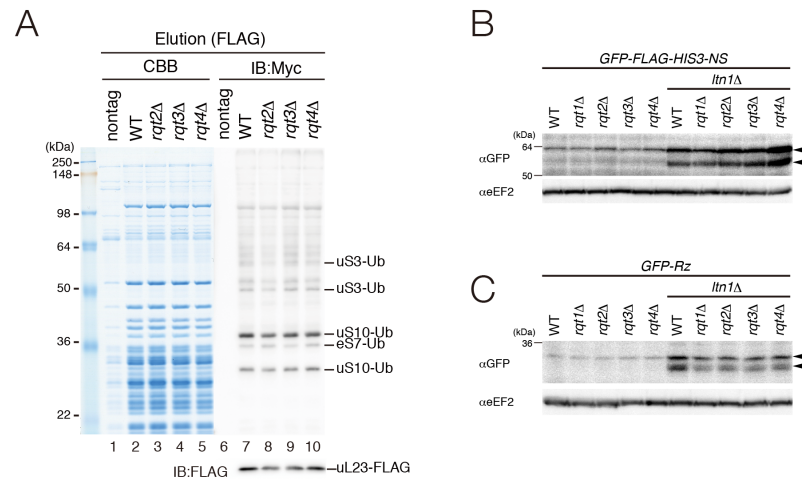


図 2-12 Rpt 因子はリボソームのユビキチン化およびノンストップ由来の RQC に関与しない。

(A) 表記の株に Rpl25-FLAG, Hel2, Myc-Ub を発現するプラスミドを導入し、培養、集菌、ライセート調整後、抗 FLAG ビーズを用いてリボソームを精製した。精製サンプルに関して、ウエスタンブロッティング法により、ユビキチン化タンパク質は抗 Myc 抗体を、bait は抗 FLAG 抗体を用いて検出した。(B-C) Rpt 因子は終止コドンを持たない mRNA 由来のノンストップタンパク質およびトランケートタンパクの分解に不要である。GFP-FLAG-HIS3-nonstop(NS) または GFP-Rz レポーターを発現する表記の株に関して、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりレポーター由来タンパク質を検出した。eEF2 はローディングコントロール。

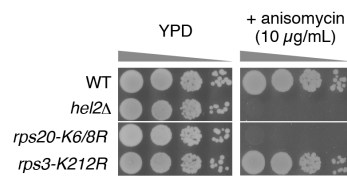


図 2-13 *Hel2* 欠損株および *rps20-K6R/K8R* 変異株はアニソマイシン感受性を示す。

表記の株に関して、YPD もしくは YPD+10μg/mL anisomycin 培地を用いてスポットアッセイを行なった。表記の株を YPD 培地にて一晚培養後 OD600 = 0.5 から 10 倍希釈ごとにスポットし、30°Cにて 40 時間培養した。

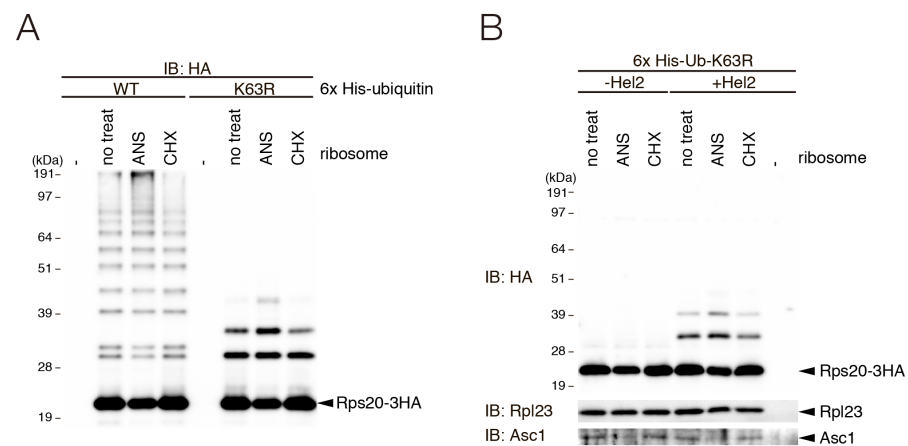


図 2-14 Hel2 は rotated state で停滞したリボソームをユビキチン化基質とする。

(A-B) anisomycin または cycloheximide 処理により翻訳伸長停滞したリボソームを精製し、Hel2 の基質として *in vitro* ユビキチン化実験を行なった。26°C で 15 分反応後、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりユビキチン化された Rps20 を観察した。Rpl23 および Asc1 はリボソーム量のコントロールとして検出した。(A) 反応系に野生型 His- ユビキチンおよび K63R 変異型 His- ユビキチンをそれぞれ導入した。(B) K63R 変異型 His- ユビキチンを使用し、Hel2 の有無により試験管内ユビキチン化反応を行なった

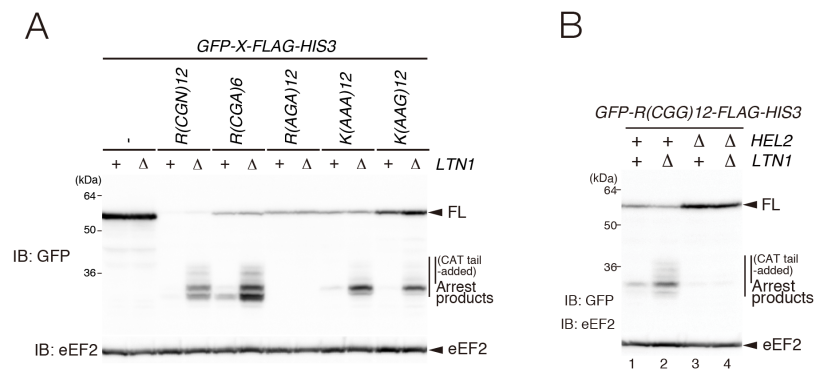


図 2-15 連続したレアコドン配列が RQC の誘導に必要である。

(A) 表記のレポーターを導入した野生株および *ltt1* 欠損株に関して、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった。(B) *GFP-R(CGG)12-FLAG-HIS3* レポーターを導入した表記の株に関して、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行なった。eEF2 はローディングコントロール。

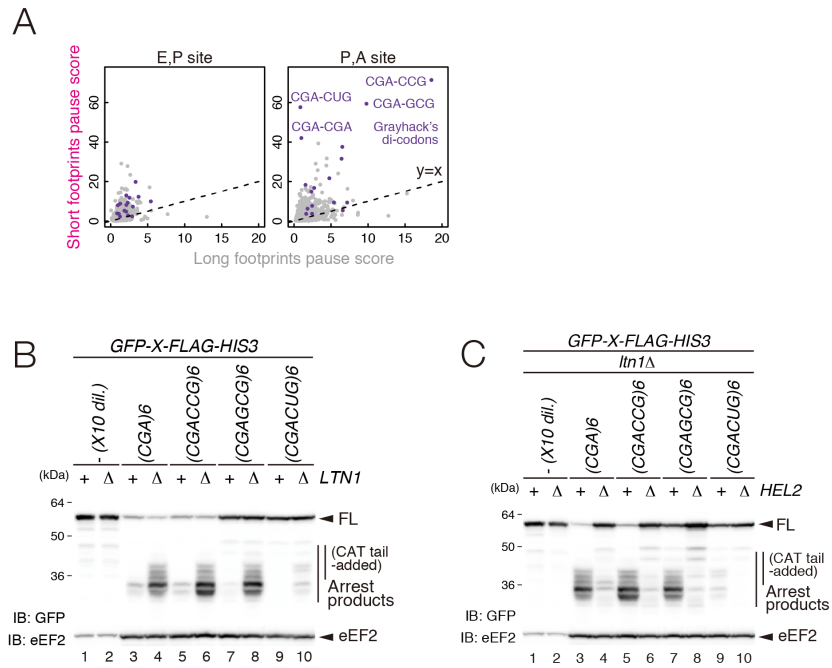


図 2-16 短い footprint を生じる停滞配列によって Hel2 依存的に RQC が生じる。

(A) 当研究室および UC Berkeley の Dr. Ingolia、岩崎信太郎博士との共同研究において、出芽酵母野生株に関して翻訳伸長阻害剤を処理せずにライブラリ作製を行ない、リボソームプロファイリングを行なったデータ解析を基に、短い footprint と長い footprint が蓄積する E-P サイトコドンペアおよび P-A サイトコドンペアに関してプロットした。表記の 4 コドンペアに関して短い footprint の顕著な蓄積が観察された。(B-C) 短い footprint が観察されたコドンペア配列を持つ解析レポーターを導入した表記の株に関して、タンパク質サンプルを調製し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行なった。eEF2 はローディングコントロール。

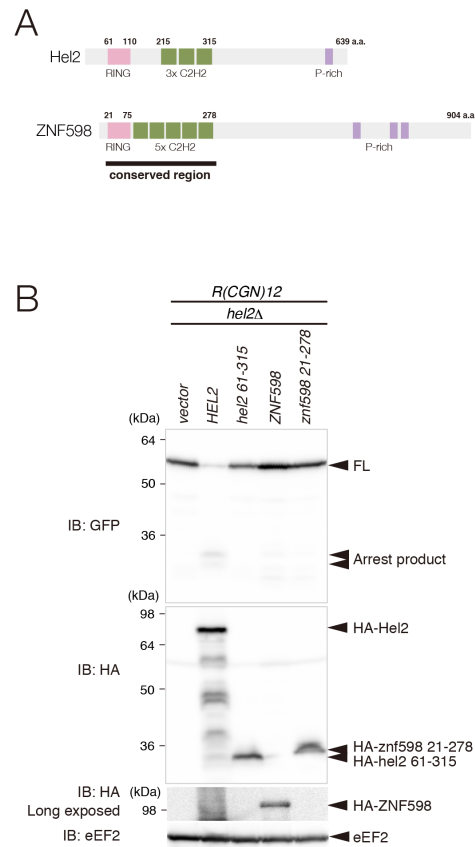
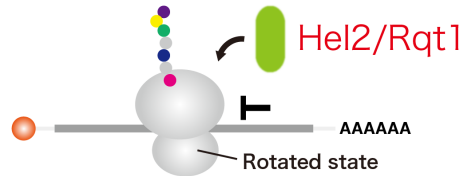


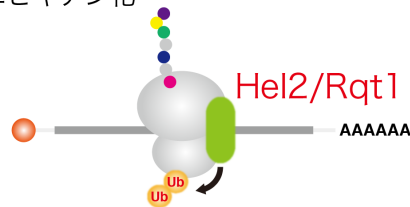
図 2-17 ZNF598 を用いた相補実験。

(A) 出芽酵母 Hel2 とヒト ZNF598 のドメイン構成。(B) 出芽酵母 *hel2Δ* 株に *GFP-R(CGNI)12-FLAG-HIS3* レポーターおよび表記の Hel2 または ZNF598 を発現するプラスミドを導入した。培養、集菌後、タンパク質サンプルを調製し、抗 GFP 抗体および抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行なった。eEF2 はローディングコントロール。

停滞したリボソームへの結合



Rps20 ユビキチン化



サブユニット解離

↓ Rqt2-3-4 ?

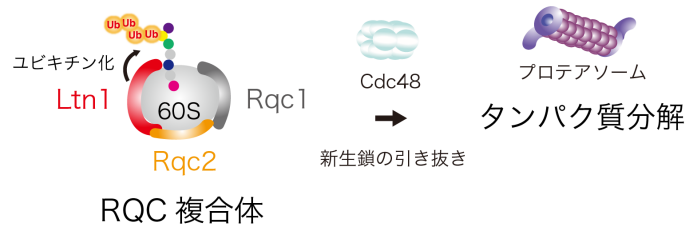


図 2-18 本研究で明らかにされた RQC 機構のモデル

翻訳停滞したリボソームは Hel2 によって認識される。停滞したリボソームが rotated state の場合、Hel2 はリボソーム上で 40S サブユニットのリボソームタンパク質 Rps20 をユビキチン化する。Rqt3 の CUE ドメインを介して、Rps20 のユビキチン化をトリガーとして認識することで、Rqt2-3-4 依存的に RQC が惹起されることが考えられる。(RQC 複合体は 60S サブユニット上に形成されるため、Rqt2-3-4 はリボソームのサブユニット解離のステップに関与する可能性が考えられる。) 解離した 60S サブユニットに Rqc1、Rqc2、Ltn1 が結合することで RQC 複合体が形成され、RQC 複合体上で Ltn1 が新生鎖をユビキチン化する。その後 Cdc48 複合体によってユビキチン化された新生鎖が認識されて引き抜かれ、最終的にプロテアソーム依存的に分解される。

NGD

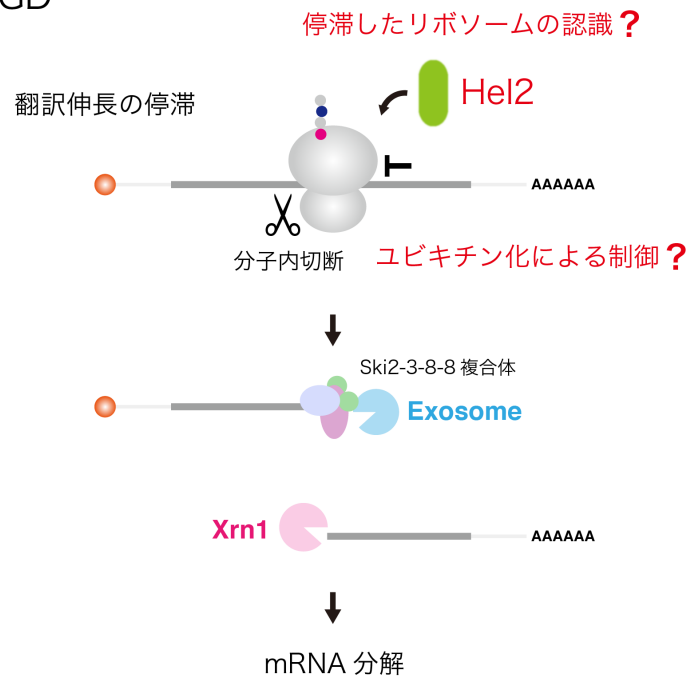


図 3-1 現在までに明らかにされている NGD 機構

NGD 機構では、リボソームが停滞すると、停滞したリボソームの近傍で mRNA が未知のエンドヌクレアーゼにより分子内切断を受ける。切断されて産生された 5' 側中間産物と 3' 側中間産物はそれぞれ Exosome および Xrn1 エクソヌクレアーゼにより迅速に分解される。翻訳伸長停滞に起因する RQC 機構においては、Hel2 が停滞したリボソームを認識して結合し、Rps20 をユビキチン化することで RQC を惹起するが、NGD においても同様の認識・トリガー機構が関与する可能性が予想された。

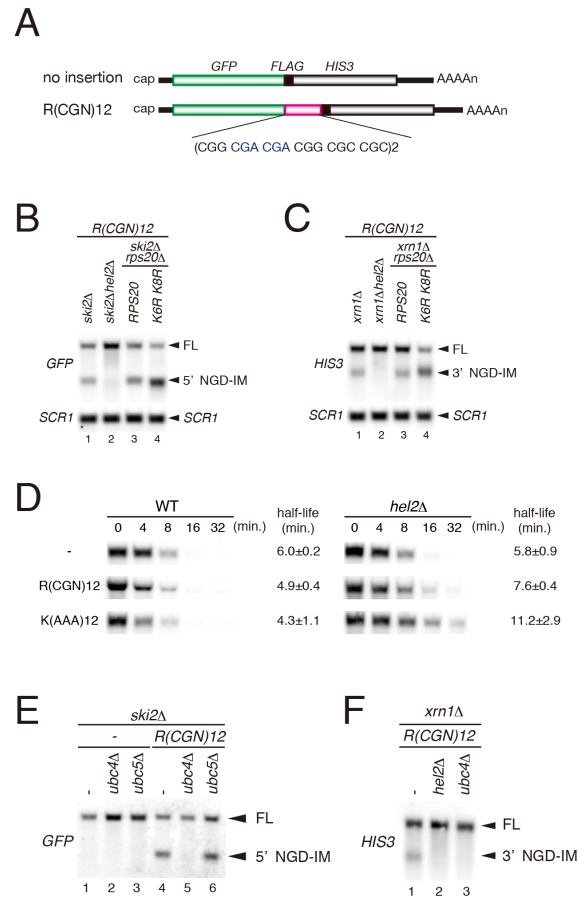


図 3-2 Hel2 は NGD における mRNA 分子内切断に必須である。

(A) 本研究に用いたレポーター遺伝子の模式図。翻訳伸長停滞配列である R(CGN)12 には、CGA-CGA レアコードクラスターが含まれる。(B-C) Hel2 は mRNA 分子内切断に必須である。Rps20KR 株では mRNA 分子内切断サイトが変化する。R(CGN)12 レポーターを導入した表記の株を、培養・集菌後、Total RNA を抽出した。RNA サンプルは、DIG 標識した GFP プローブまたは HIS3 プローブと抗 DIG 抗体を用いたノーザンブロットングにより解析した。FL: 全長 mRNA、IM: 中間産物、SCR1: ローディングコントロールとして検出したノンコーディング RNA。(D) Hel2 依存的な mRNA 分子内切断は、停滞配列を持つ mRNA の半減期に影響する。GAL1 プロモーター下に繋いだ no insertion、R(CGN)12、K(AAA)12 各レポーターを導入した野生株または *hel2* 欠損株を用いて、mRNA の半減期測定を行なった。B と同様の手法でノーザンブロットングを行なった。(E-F) Ubc4 は mRNA 分子内切断に必須である。no insertion または R(CGN)12 レポーターを導入した表記の株から RNA を抽出し、B と同様の手法でノーザンブロットングを行なった。

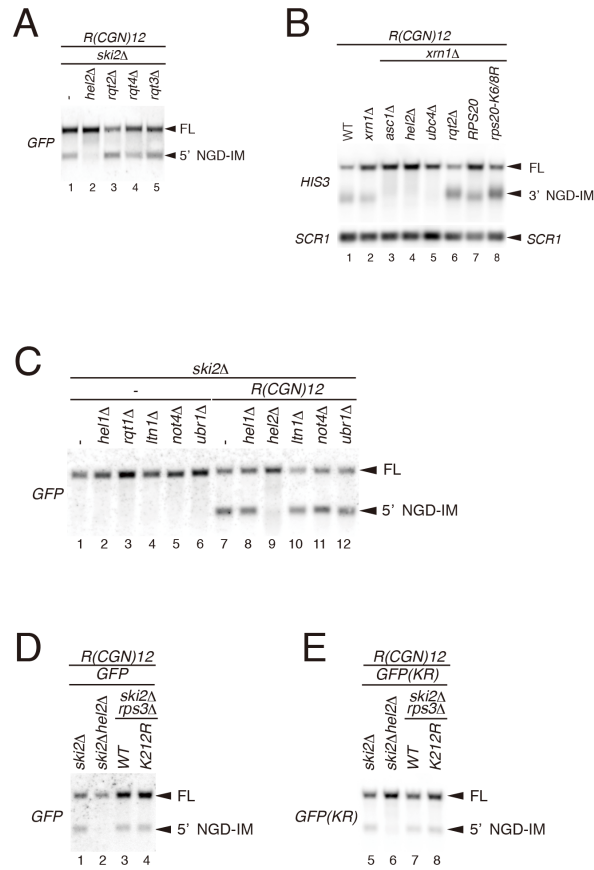


図 3-3 Rqt2 および Rps20 のユビキチン化は正確なサイトでの mRNA 分子内切断に必要である。

(A-E) no insertion または *R(CGN)12* レポーターを導入した各株から抽出した Total RNA サンプルに関して、DIG 標識した *GFP* プローブ、*GFP(KR)* プローブ、*HIS3* プローブと抗 DIG 抗体を用いたノーザンブロッティングにより解析した。FL: 全長 mRNA、IM: 中間産物、*SCR1*: ローディングコントロールとして検出したノンコーディング RNA。(A) Rqt2-3-4 は mRNA 分子内切断に不要である。(B) プライマーエクステンションにおいて使用した RNA サンプルの確認。(C) タンパク質品質管理機構に関与する他の E3 リガーゼは mRNA 分子内切断に関与しない。(D) Rps3 のユビキチン化は mRNA 分子内切断に関与しない。(E) 新生鎖のユビキチン化は mRNA 分子内切断に影響を与えない。

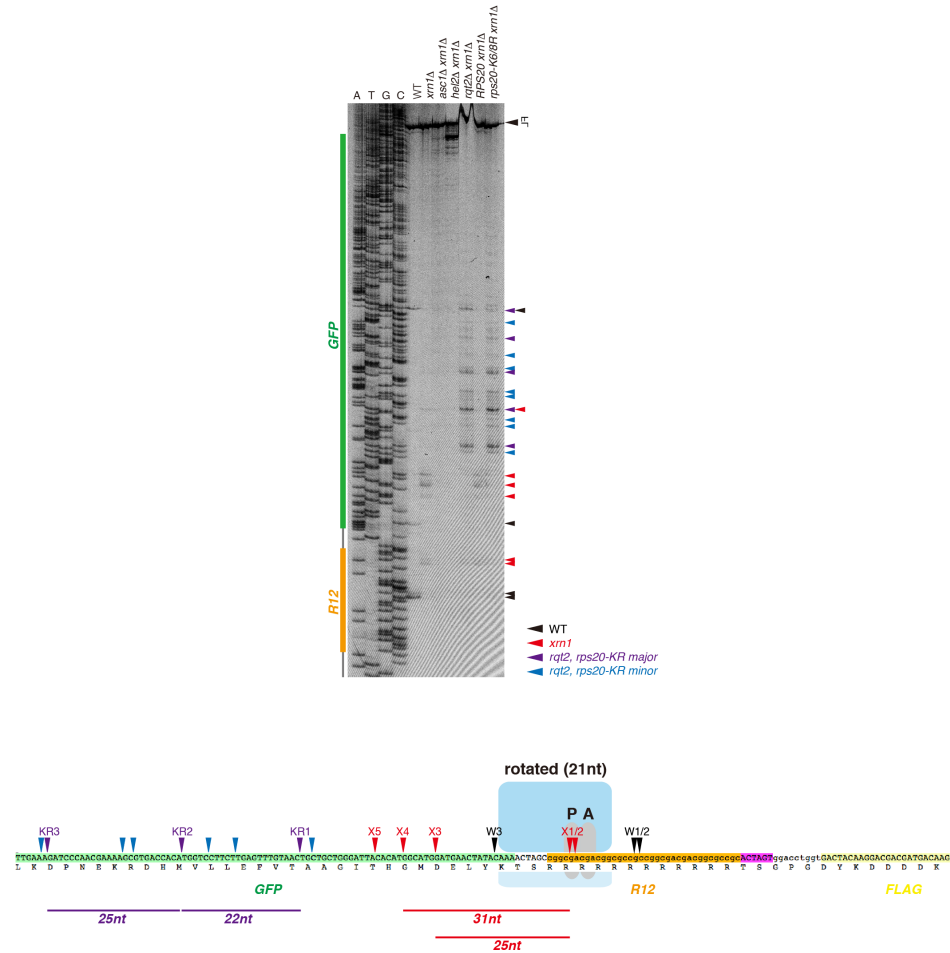


図 3-4 *rqt2*Δ株および *rps20-K6R/K8R* 変異株では mRNA 分子内切断サイトが上流側にシフトする。

(上) 図 3-3 B にて泳動確認した Total RNA をテンプレートとして、5' 側に IRDye-700 蛍光ラベルしたプライマー (5' -TATCGCTAGGGGACCACCCTTTA-3') を用いてプライマーエクステンション法による NGD 分子内切断サイトの同定をおこなった。逆転写したサンプルをシーケンサダーとともに 5% TBE-Urea PAGE により展開後、プライマーに標識した IRDye-700 の蛍光を FLA-9000 を用いて検出した。(下) プライマーエクステンション解析の結果、観察された野生株のプロセシングサイト (黒矢印) および *xrn1* 欠損下で観察された mRNA 切断サイト (赤矢印) をマップした。また、*rqt2* 欠損株および *rps20-K6R/K8R* 変異株で観察された mRNA 切断サイトは従来の切断サイトよりも上流側にシフトしていた (紫および青矢印)。

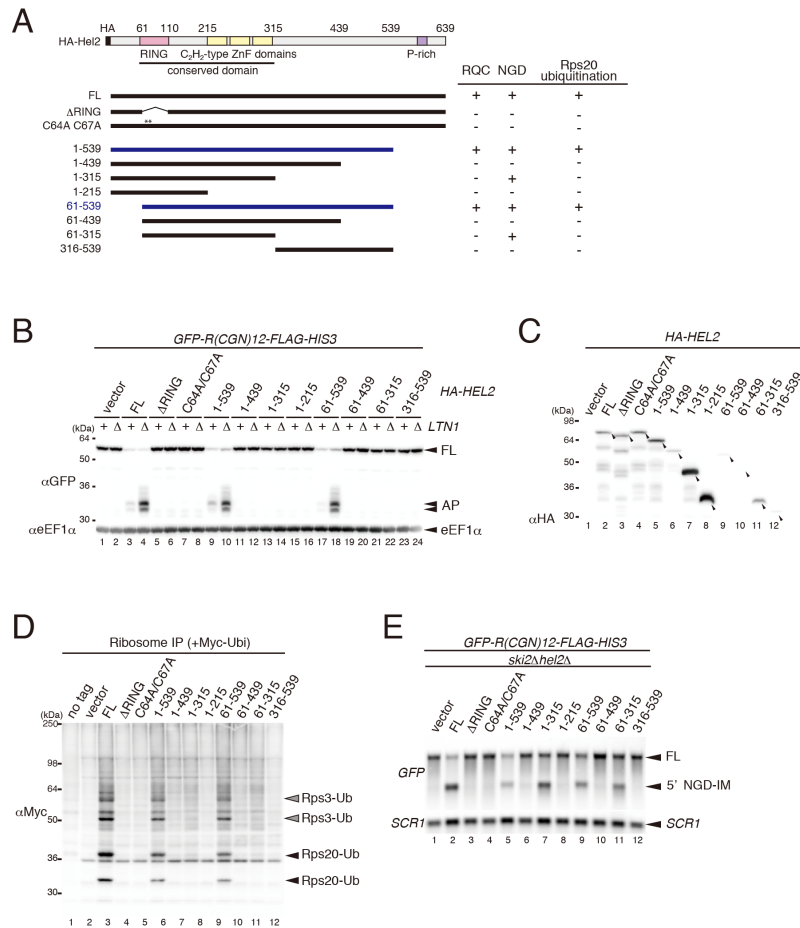


図 3-5 RQC および NGD における Hel2 のドメイン解析。

(A) Hel2 のドメイン構成および作製した変異体の模式図。RING-ZnF ドメイン間はヒトまで保存されている。RQC、NGD 惹起能および Rps20 ユビキチン化能を右に示す。(B) R(CGN)12 レポーターおよび表記の Hel2 変異体を発現する表記の株に関して、タンパク質サンプルを調整後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより全長 (FL) もしくはアレスト産物の検出を行なった。ローディングコントロールとして eEF1 α を検出した。(C) Hel2 各変異体を発現する株に関して、タンパク質サンプルを調整後、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより発現量を確認した。(D) 表記の株に Rpl25-FLAG, HA-Hel2 各変異体, Myc-Ub を発現するプラスミドを導入し、培養、集菌、ライセート調整後、抗 FLAG ビーズを用いてリソソームを精製した。精製サンプルに関して、ウエスタンブロッティング法をにより、ユビキチン化タンパク質は抗 Myc 抗体を用いて検出した。(E) R(CGN)12 レポーターと Hel2 各変異体を導入した各株から抽出した Total RNA サンプルに関して、DIG 標識した GFP プローブと抗 DIG 抗体を用いたノーザンブロッティングにより解析した。FL: 全長 mRNA, IM: 中間産物, SCR1: ローディングコントロールとして検出したノンコーディング RNA。

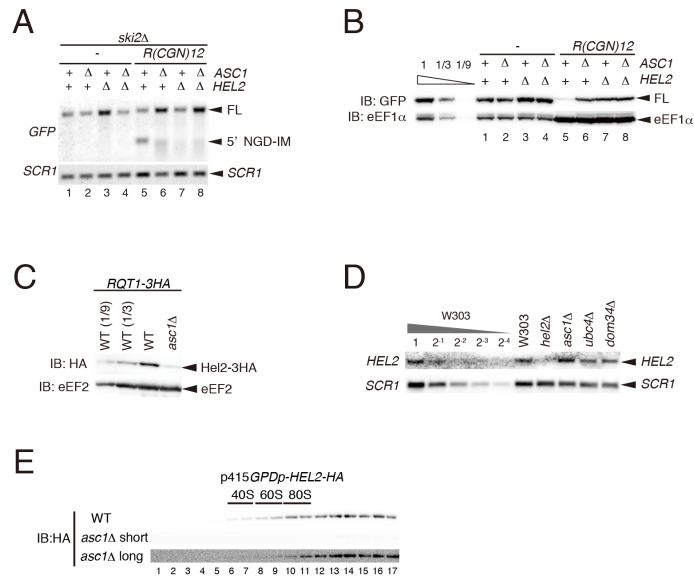


図 3-6 Asc1 と Hel2 の相互関係解析。

(A) Asc1 は mRNA 分子内切断に重要な因子である。no insertion または R(CGN)12 レポーターを導入した各株から抽出した Total RNA サンプルに関して、DIG 標識した *GFP* プローブと抗 DIG 抗体を用いたノーザンブロットングにより解析した。FL: 全長 mRNA、IM: 中間産物、*SCR1*: ローディングコントロールとして検出したノンコーディング RNA。(B) Asc1 と Hel2 は同一の経路で翻訳伸長停滞に関与する。(C) *asc1* 欠損下では Hel2 のタンパク質発現量が低下する。(D) *asc1* 欠損下では *HEL2* mRNA 量は僅かに増加する。(E) *asc1* 欠損下においても Hel2 のポリソーム局在は変化しない。

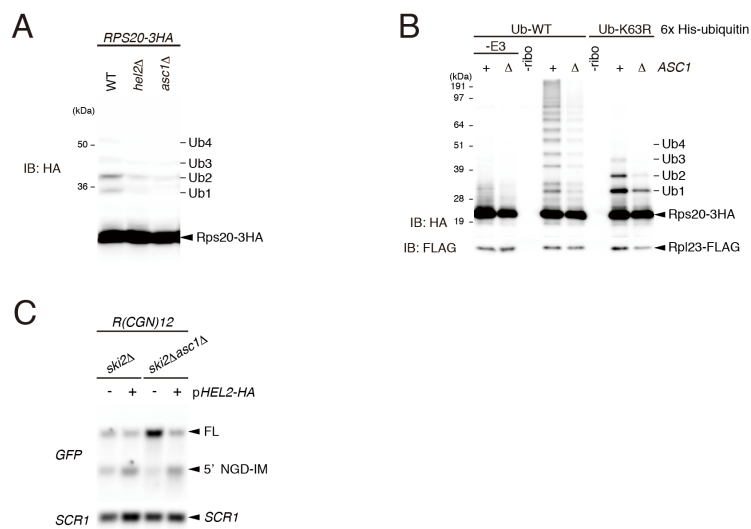


図 3-7 Asc1 は Hel2 による効率的なユビキチン化に必須である。

(A) *asc1* 欠損下では Rps20 のユビキチン化レベルが低下する。(B) Asc1 は *in vitro* において Hel2 による Rps20 の効率的なユビキチン化に寄与する。(C) Hel2 の過剰発現は *asc1* 欠損による mRNA 分子内切断効率の低下を相補する。

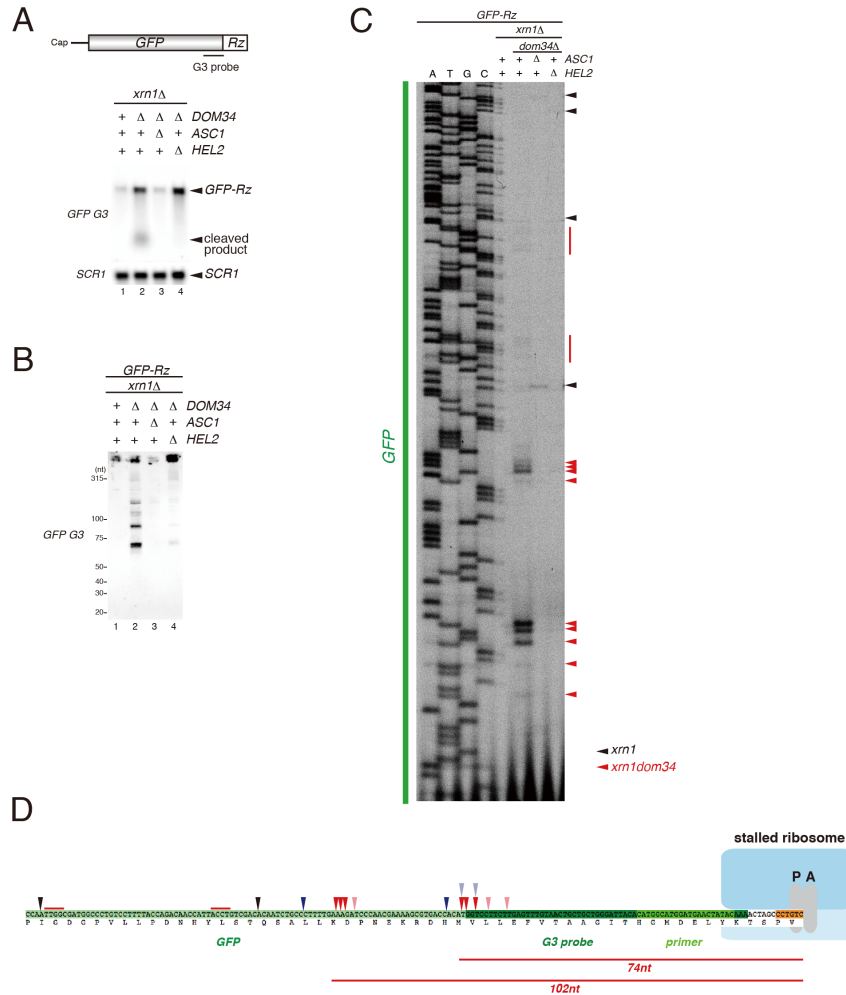


図 3-8 Hel2 は Dead-end NGD における mRNA 分子内切断に重要である。

(A-B) Asc1 および Hel2 は Dead-end NGD における mRNA 分子内切断に重要な因子である。GFP-Rz を発現する表記の出芽酵母株から RNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動または TBE-Urea PAGE により分離後、GFP G3 プローブを用いたノーザンブロッティングにより解析した。(C) A-B において解析した RNA に関して、5' 側に IRDye-700 蛍光ラベルしたプライマー (5' -GTATAGTTCATCCATGCCATG-3') を用いてプライマーエクステンション法による Dead-end NGD における分子内切断サイトの同定をおこなった。図 3-4 と同様の方法で検出をおこなった。(D) プライマーエクステンション解析から得られた切断サイトのマップ。Dead-end NGD における mRNA 分子内切断はリボソームが 3 個または 4 個停滞した位置で生じることが確認された。

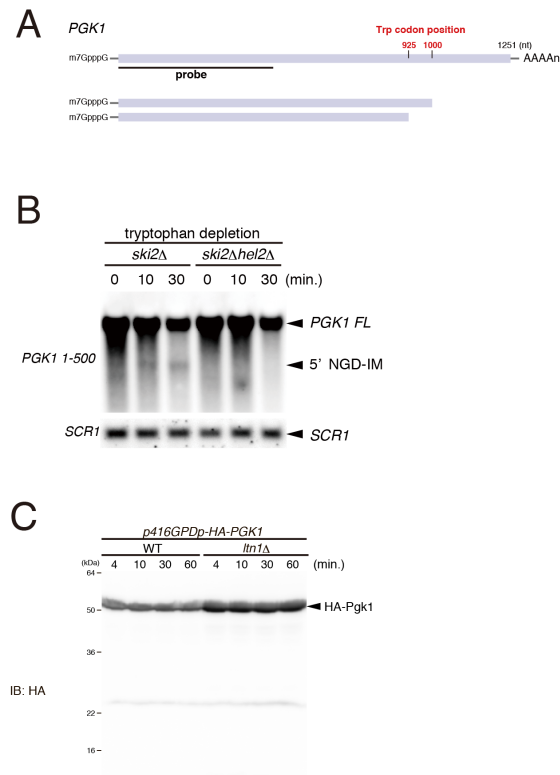


図 3-9 Hel2 はアミノ酸欠乏条件下で停滞したリボソームに起因する mRNA 分子内切断に必須である。

(A) *PGK1* の模式図。 *PGK1* は 2 つのトリプトファンコドンもつ mRNA である。トリプトファン欠乏時に、コドンの近傍で mRNA が分子内切断を受けると予想される。(B) トリプトファン欠乏下において *PGK1* mRNA はコドンの近傍で Hel2 依存的に分子内切断を受ける。 *ski2Δ* 株または *ski2Δhel2Δ* 株を SDC 培地にて OD600 = 0.5 まで培養後、SDC-Trp 培地に培地交換し、経時的にサンプリングした。RNA サンプルを調製後、表記のプロープを用いたノーザンブロットングにより解析した。(C) トリプトファン欠乏による翻訳伸長停滞は RQC を惹起しない。 *p416GPDp-HA-PGK1* を導入した野生株または *ltn1Δ* 株を SDC 培地にて OD600 = 0.5 まで培養後、SDC-Trp 培地に培地交換し、経時的にサンプリングした。タンパク質サンプルを調製後、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットングにより解析した。

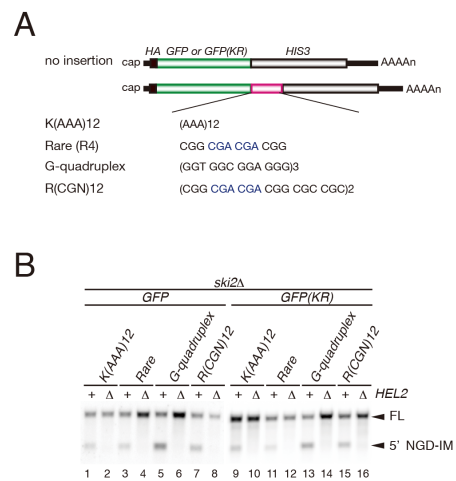


図 3-10 Hel2 は様々な翻訳停滞配列に起因する mRNA 分子内切断に必須である。

(A) 解析に用いたレポーターの模式図。(B) Hel2 は mRNA 分子内切断に必須な因子であるが、ユビキチン化の標的分子は新生鎖ではない。各レポーターを導入した株から抽出した Total RNA サンプルに関して、DIG 標識した *GFP* プロブまたは *GFP(KR)* プロブと抗 DIG 抗体を用いたノーザンブロットングにより解析した。FL: 全長 mRNA、IM: 中間産物。

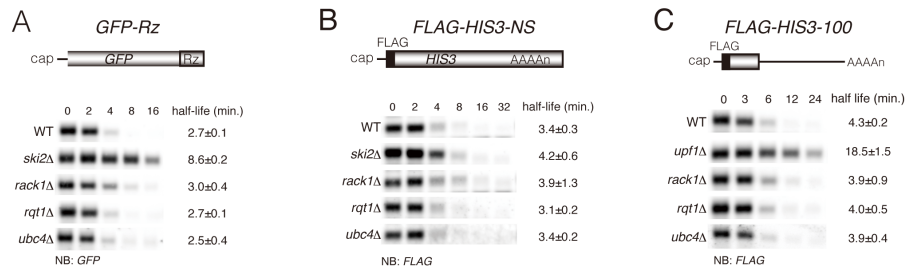


図 3-11 Hel2 は NMD および NSD に関与しない。

(A) Hel2 は Dom34 存在下ではトランケート mRNA の分解に関与しない。p416*GAL1-GFP-Rz-FLAG-HIS3* を含むプラスミドを導入した表記の出芽酵母株に関してガラクトース存在下で対数増殖期まで培養後、*GAL1* プロモーターの転写誘導をオフにするため SDC 培地に培地交換し、経時的にサンプリングした。RNA サンプルを調整後、*GFP* プローブを用いたノーザンブロットングにより解析した。(B) Hel2 はノンストップ mRNA 分解に関与しない。p416*GAL1-FLAG-HIS3-NS* を含むプラスミドを導入した表記の出芽酵母株に関して (A) と同様にサンプリングし、*FLAG* プローブを用いたノーザンブロットングにより解析した。(C) Hel2 は NMD に関与しない。p416*GAL1-FLAG-HIS3-100* を含むプラスミドを導入した表記の出芽酵母株に関して (A) と同様にサンプリングし、*FLAG* プローブを用いたノーザンブロットングにより解析した。

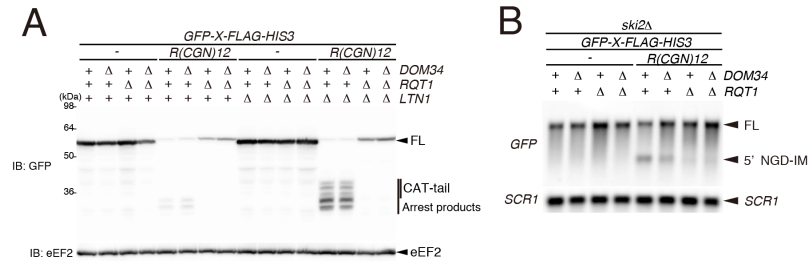


図 3-12 Dom34 は翻訳伸長停滞に起因する mRNA 分子内切断および RQC には必要ない。

(A) Dom34 は翻訳伸長停滞に起因する RQC の惹起には関与しない。GFP-FLAG-HIS3 または GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3 レポーターを導入した表記の出芽酵母株から調製したタンパク質サンプルに関して、抗 GFP 抗体および抗 eEF2 抗体を用いたウエスタンブロットングを行なった。(B) Dom34 は R(CGN)12 配列によって生じる翻訳伸長停滞に起因する mRNA 分子内切断に必須な因子ではない。GFP-FLAG-HIS3 または GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3 レポーターを導入した表記の出芽酵母株から調製した Total RNA サンプルに関して、GFP プローブおよび SCR1 プローブを用いたノーザンブロットングを行なった。

Dead-end NGD

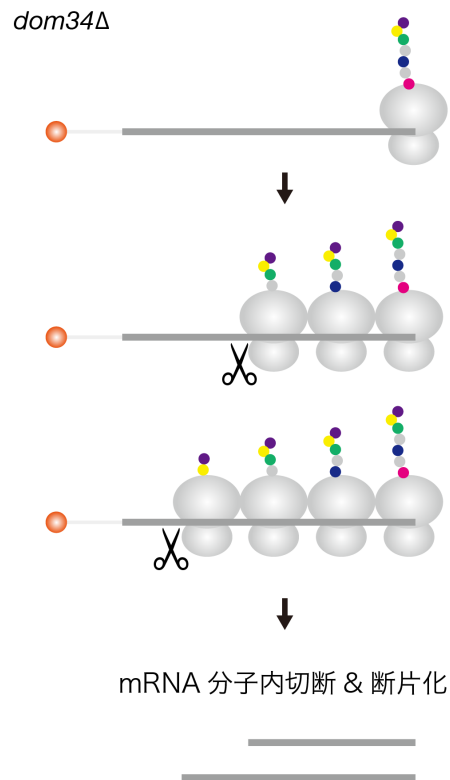


図 4-1 Dead-end NGD の分子機構モデル。

終止コドンを持たないトランケート mRNA の末端で停滞したリボソームは Dom34 依存的にサブユニット解離し、リサイクリングされる。一方で Dom34 非存在下では、リボソームはトランケート mRNA の末端で停滞し続けるため、後続のリボソームが次々と末端で停滞する。このように停滞リボソームによって生じる後続のリボソームの停滞によって惹起される mRNA 分子内切断機構を Dead-end NGD と呼称する。Dead-end NGD には Asc1/RACK1 が必須である。また Hel2 は必須ではないものの、欠損下では分子内切断産物が劇的に減少するため、重要な因子であると考えられる。

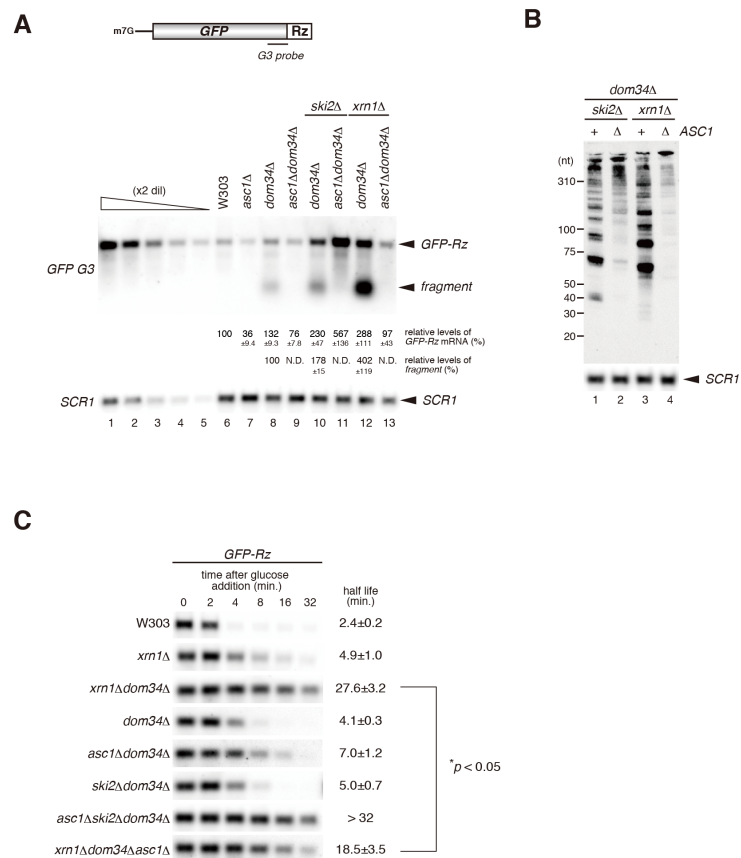


図 4-2 Asc1 は Dead-end NGD に必須である。

(A-B) Asc1 欠損下では 3' 末端で停滞したリボソームに起因する分子内切断産物が観察されない。(A) ノーザンプロット法により表記の株における分子内切断産物の検出を行なった。G3 プローブは *GFP* の 3' 側に相補する。(B) TBE-Urea PAGE を用いたノーザンプロット法により分子内切断産物の検出を行なった。(C) G3 プローブを用いたノーザンプロット法により表記の株における *GFP-Rz* mRNA の半減期測定を行なった。3 回の独立試行実験から定量算出した半減期 ± SEM を示した。

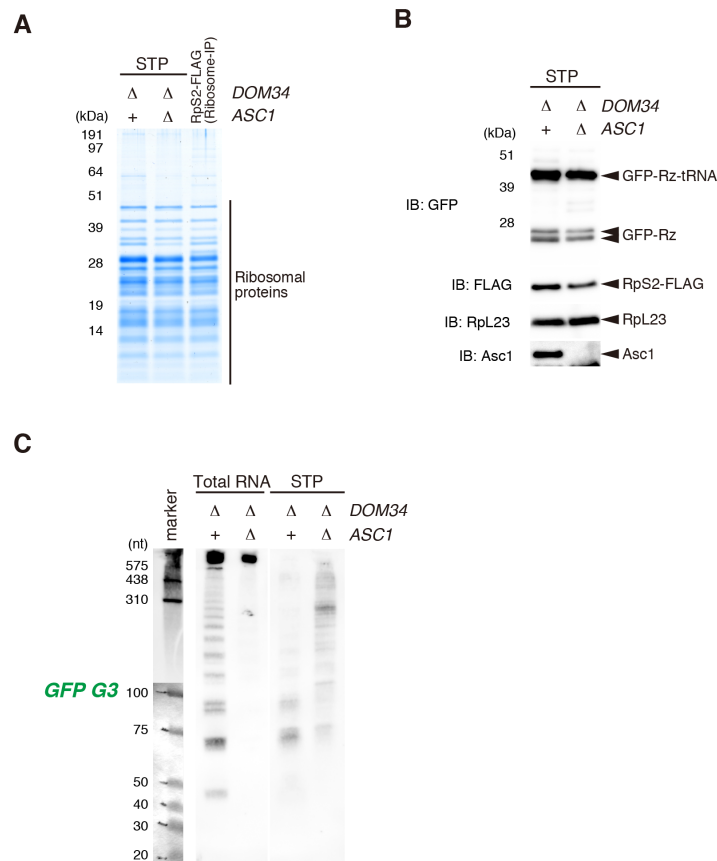


図 4-3 *GFP-Rz* mRNA の 3' 末端で停滞リボソームの精製。

(A) *GFP-Rz* mRNA の 3' 末端で停滞したリボソームを Split-tag purification (STP) 法により精製した。*ProteinA-TEV-GFP-Rz* レポーターおよび *Rps2-FLAG* を発現するプラスミドを導入した表記の株に関してライセートを調整し、IgG ビーズを用いて精製後、タバコモザイクウイルス (TEV) プロテアーゼ処理を行ないビーズから溶出した。溶出画分を抗 FLAG ビーズを用いて再度精製を行ない、得られた精製サンプルを PAGE および CBB 染色により観察した。精製リボソームのコントロールとして、*Rps2-FLAG* 精製サンプルを用いた。(B) 精製サンプルに関して抗 GFP 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 Rpl23 抗体および抗 Asc1 抗体を用いてウェスタンブロットングを行なった。(C) 精製画分から RNA を抽出し、TBE-Urea PAGE を行なった後、*GFP G3* プローブを用いたノーザンブロット法により、mRNA 切断産物の検出を行ない、コントロールの Total RNA と比較した。

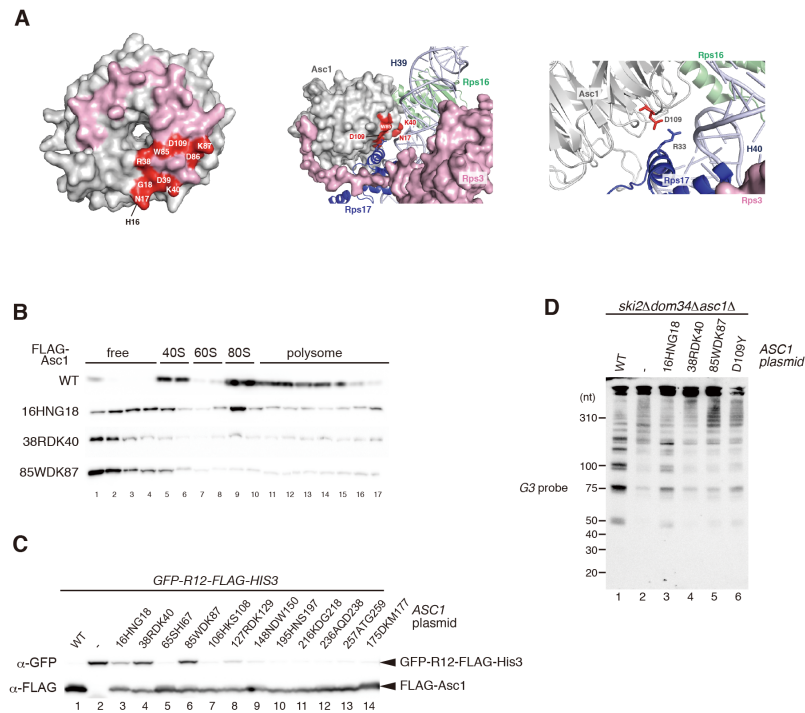


図 4-4 Asc1 のリボソームへの結合は Dead-end NGD に重要である。

(A) Asc1 変異体の変異の位置を構造上にマッピングした。(左)Asc1 の構造。変異を導入した残基を赤色または桃色で示した。赤色の残基は置換変異によりリボソームとの相互作用に欠損を示した残基。(中央)40S サブユニット上の Asc1 の構造。(右) Asc1 D109 は Rps17 R33 と相互作用する。構造は PyMol (www.pymol.org) を用いて作製した。(B) Asc1 変異体のポリソーム解析。38RDK40AAA および 85WDK87AAA のリボソーム結合能は野生株と比較して低下していた。FLAG-Asc1 野生型または変異体を発現する出芽酵母株由来ライセートをシロ糖密度勾配遠心により分離、各フラクションに分画後タンパク質サンプルを調製し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットングにより解析した。(C) R(CGN)12 配列による翻訳アレスト効率は Asc1 のリボソームとの結合能に相関する。R(CGN)12 レポーターおよび表記の FLAG-Asc1 発現プラスミドを導入した出芽酵母株からタンパク質サンプルを調製し、抗 GFP 抗体および抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットングにより解析した。(D) Asc1 のリボソームとの結合は Dead-end NGD に重要である。出芽酵母株から Total RNA サンプルを調製し、TBE-Urea PAGE を用いたノーザンブロット法により Dead-end NGD によって生じる mRNA 切断産物の検出を行なった。

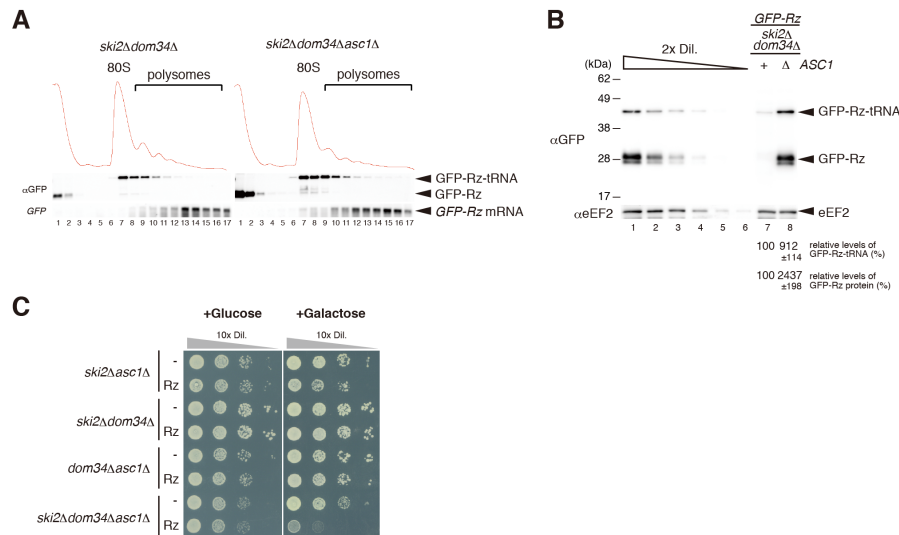


図 4-5 Asc1 欠損下では GFP-Rz-tRNA および GFP-Rz タンパク質の量が増加する。

(A) Asc1 非存在下において、GFP-Rz ペプチジル tRNA がモノソームおよびポリソームに多く蓄積した。GFP-Rz レポーターを導入した表記の出芽酵母株ライセートを 10-50% ショ糖密度勾配遠心により分離、フラクションに分画した。各フラクションにおける 254nm の吸光をプロットした。各フラクションからサンプルを調整し、中性ゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングにより解析した。また各フラクションから RNA サンプルを調製し、ノーザンブロッティングにより *GFP-Rz* mRNA を検出した。(B) Asc1 欠損下では GFP-Rz ペプチジル tRNA および GFP-Rz タンパク質の細胞内存在量が増加した。表記の出芽酵母株からライセートを調整し、中性ゲル電気泳動および抗 GFP 抗体、抗 eEF2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。(C) GFP-Rz mRNA の過剰発現は *ski2dom34asc1* 三重欠損株の生育を阻害する。p416*GAL1p-GFP-FLAG-HIS3* または p416*GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3* プラスミドを導入した表記の出芽酵母株を SC-2% ラフィノース培地で一晚培養後、開始点を OD600 = 0.3 として 10 倍希釈系列を作製し、SDC 培地および SC-2% ガラクトース培地にスポットし、48 時間 (SDC 培地) または 72 時間 (SC-2% ガラクトース培地) 培養した。

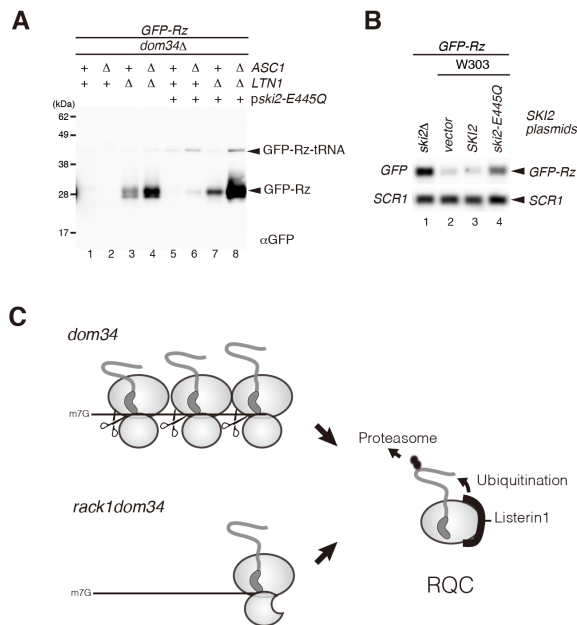


図 4-6 Dom34 および Asc1 非存在下においても RQC は惹起される。

(A) Asc1 非存在下においても RQC は惹起される。p416GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 プラスミドおよび p415GPDp-ski2-E445Q プラスミドを導入した表記の出芽酵母欠損株からライセートを調製し、中性ゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングにより GFP-Rz-tRNA および GFP-Rz タンパク質を観察した。(B) ski2-E445Q 変異体はドミナントネガティブ変異体として内在の Ski2 および exosome の活性を阻害する。p416GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 プラスミドおよび表記の SKI2 発現プラスミドを導入した野生株、または ski2Δ 株を培養後、RNA サンプルを調製し、ノーザンブロッティングにより解析した。(C) Dom34 非存在下において停滞したリボソームに起因して起こる mRNA 分子内切断機構 Dead-end NGD に Asc1 が必須である。半減期測定の結果および GFP-Rz ペプチジル tRNA の解析から、Asc1 非存在下ではリボソームがノンストップ mRNA の末端で停滞した際に、一定の頻度で mRNA からリボソームが解離するモデルが考えられる。また、Dom34 非存在下で停滞したリボソームに起因して RQC が惹起されるため、リボソームの解離には Dom34 は不要であるモデルが考えられる。

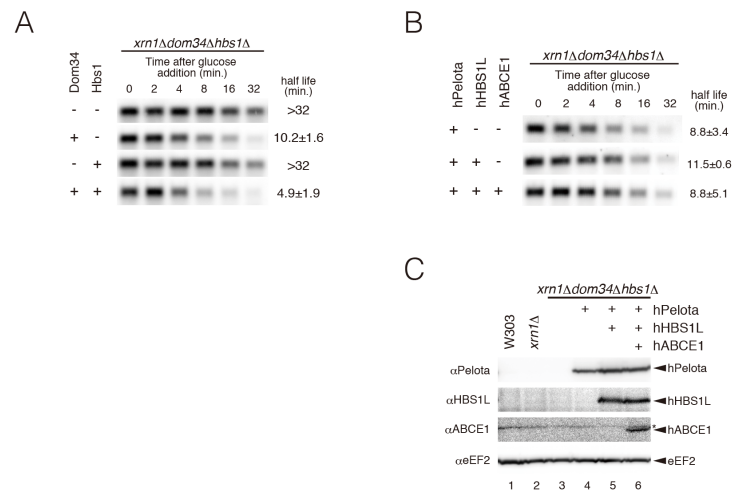


図 4-7 ヒト Pelota-Hbs1L は出芽酵母において、リボソームのサブユニット解離に機能する。

(A-B) G3 プローブを用いたノーザンプロット法による *GFP-Rz* mRNA の半減期測定実験。
p413GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 プラスミドを導入した *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* 株に Dom34、Hbs1、hPelota、
 hHBS1L、hABCE1 を発現するプラスミドを導入し、図 4-2 C と同様の方法で解析を行なった。3 回の独立試行
 実験から定量算出した半減期 ±SEM を記載した。(C) 出芽酵母株におけるヒト Pelota、Hbs1L、Abce1 の発現
 確認。A-B で使用した出芽酵母株からタンパク質サンプルを調製し、表記の抗体を用いたウエスタンブロッティン
 グにより解析した。

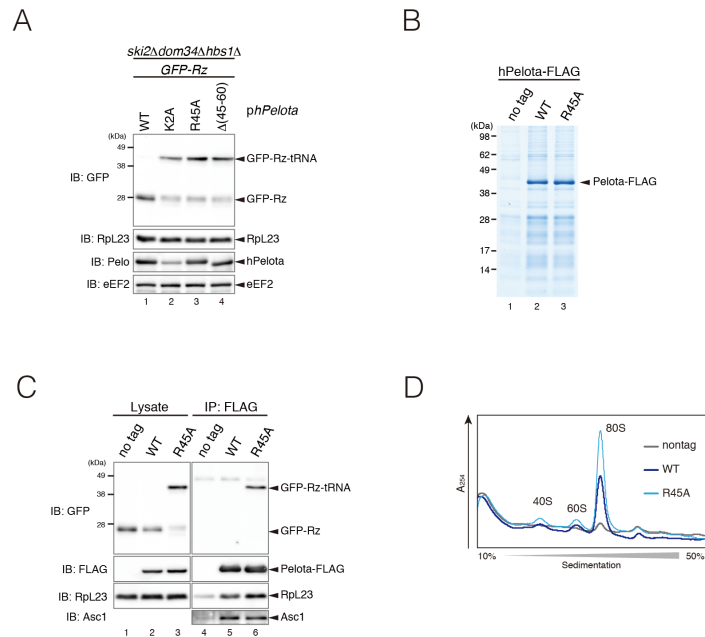


図 4-8 *GFP-Rz* mRNA の末端で停滞したリボソームは Pelota R45A 変異体と共精製される

(A) Pelota 変異体発現株由来の Total ライセートを用いて、中性 PAGE- ウェスタンブロッティングにより *GFP-Rz*-ペプチジル tRNA の検出および Pelota の発現確認を行なった。Rpl23 および eEF2 はローディングコントロールとして検出した。(B) Pelota と出芽酵母リボソームは共精製される。C 末に FLAG タグを付加した Pelota 野生型または変異型を発現する出芽酵母ライセートから、抗 FLAG 抗体ビーズを用いて Pelota を精製した。精製サンプルを PAGE および CBB 染色により解析した。(C) Pelota R45A 変異体と *GFP-Rz* mRNA の末端で停滞したリボソームは共精製される。B において精製したサンプルを中性 PAGE および表記の抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。(D) Pelota 精製サンプルに関して、10-50% ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析を行ない、各フラクションにおける 254nm の吸光をプロットした。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました指導教員 稲田利文 教授には深く感謝しております。主査 松沢 厚 教授、副査 矢野 環 准教授には、博士論文審査において、多くのご質問ご助言ご鞭撻を賜り、大変感謝しております。

本研究室の松尾芳隆 助教、宇田川剛 助教にはゼミにおけるご指導、実験の具体的手法等ご教授頂き、稲田敦子様、齋藤美千代様には事務関連・各種手続き等遂行して頂き大変感謝しております。

東京都医学総合研究所 田中啓二 研究所長、佐伯 泰 副参事研究員および研究所の皆様には、共同研究において大変お世話になりました。また、実験材料を譲渡して頂きました。UC Berkeley の Dr. Nicholas Ingolia、理化学研究所の岩崎信太郎 准主任研究員には、共同研究および論文・研究ディスカッションにおいて、大変お世話になりました。京都大学 大野睦人教授、北畠真 助教には、本研究に必須の材料を譲渡頂きました。皆様に感謝申し上げます。

I would like to thank Prof. Roland Beckmann, Dr. Thomas Becker and Christian Schmidt, LMU Munich for your clear-cut lecture about cryo-EM structural analyses and discussion, as well as your kindness.

稲田研究室の皆様、OBOG の皆様、東北薬科大学 関 政幸 教授には研究室生活において、大変お世話になりました。皆様に感謝を申し上げます。

副論文

Conserved functions of human Pelota in mRNA quality control of nonstop mRNA

Ken Ikeuchi, Erina Yazaki, Kazuhei Kudo and Toshifumi Inada

Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Japan

Correspondence

T. Inada, Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan
Fax: +81 (22) 795 6873
Tel: +81 (22) 795 6874
E-mail: tinada@m.tohoku.ac.jp

(Received 21 June 2016, revised 12 August 2016, accepted 15 August 2016, available online 7 September 2016)

doi:10.1002/1873-3468.12366

Edited by Michael Ibba

Dom34-Hbs1 plays crucial roles in Nonstop Decay (NSD) and No-Go Decay (NGD). Here, we report a conserved function of human Pelota (hPelota) in mRNA quality control of nonstop mRNA. hPelota facilitated the expression of the nonstop products from *GFP-Rz* mRNA, which lacks a termination codon and a poly(A) tail, in exosome-defective mutant cells. hPelota promoted the dissociation of stalled ribosomes at the 3' end of *GFP-Rz* mRNA, and mutations in domain A diminished this activity. The hPelota-R45A mutant associated with ribosomes but was defective in peptide release. Finally, hPelota promoted the degradation of *GFP-Rz* mRNA and suppressed the sequential endonucleolytic cleavages caused by stalled ribosomes at the 3' end of mRNA in *dom34Δ* mutant cells.

Keywords: mRNA quality control; nonstop decay; Pelota; stalled ribosomes

Quality controls of aberrant mRNA repress translation and promote protein degradation as well as mRNA degradation to prevent the production of potentially harmful protein products [1–8]. Nonstop Decay (NSD) recognizes stalled ribosomes at the 3' end of mRNA, and eliminates aberrant mRNA lacking a termination codon by stimulating exosome-dependent 3'-to-5' degradation [9,10]. No-Go Decay (NGD) of mRNA is triggered by blockage of translation during the elongation step. NGD induces endonucleolytic cleavage in the vicinity of the stalled site [11]. This results in the production of two mRNA fragments, 5'-NGD and 3'-NGD intermediates, which are further degraded by the exosome and Xrn1 exoribonuclease, respectively [11]. The 5'-NGD intermediate is nonstop mRNA, and ribosomes translating a 5'-NGD intermediate may be stalled at the 3' end. The stalled ribosome must then be dissociated for rapid degradation by the exosome.

The Dom34-Hbs1 complex promotes subunit dissociation of stalled ribosomes and peptidyl-tRNA drop-off [12,13]. The Dom34-Hbs1 complex dissociates

ribosomes stalled at the 3' end of a 5'-NGD intermediate and then stimulates degradation of the 5'-NGD intermediate by the exosome *in vivo*. Dom34-Hbs1 also facilitates the degradation of nonstop mRNA from their 3' ends by exosome [14,15]. These findings indicate that Dom34-Hbs1 plays crucial roles in both NGD and NSD [14,16–18]. Dom34-Hbs1 also mediates dissociation of inactive 80S ribosomes that promote the restart of translation after stress [19].

Human Pelota (hPelota) is a homolog of yeast Dom34, and induces the dissociation of the translation elongation complex in an *in vitro*-reconstituted translation system, but only in the presence of the ATPase ABCE1 [20,21]. Recent studies showed that homologs of Dom34 facilitate the decay of nonstop mRNA in higher eukaryotes, including mammals [15]. In *Drosophila* cells, DmPelota acts in concert with ABCE1 to facilitate the production of nonstop products derived from *GFP-Rz* mRNA [22]. However, there is no *in vivo* evidence to show that homologs of Dom34 facilitate the subunit dissociation of ribosomes stalled

Abbreviations

hPelota, human Pelota; NGD, no-go decay; NSD, nonstop decay; RQC, ribosome quality control.

at the 3' end of nonstop mRNA in higher eukaryotic cells.

Ribosome profiling demonstrated crucial roles for Dom34-Hbs1 and Rli1 in ribosome recycling when 3'-UTRs are translated [23,24]. In *dom34* mutant cells, ribosome occupancy of the 3'-UTR increases dramatically upon reduction of Rli1 levels, and unrecycled ribosomes bind to the 3'-UTR of mRNA and reinitiate translation without a canonical start codon to produce small peptide products [23,24]. After Rli1 levels decrease, 80S ribosomes accumulate at both the stop codons and the adjoining 3'-UTRs of most mRNA [24]. These findings indicate that Dom34-Hbs1 and Rli1 are crucial for the rescue of ribosomes from the 3'-UTR of mRNA, and that they control the balance between synthesis and degradation. It is still unknown whether the function of Dom34 in ribosome recycling in 3'-UTRs is conserved in higher eukaryotes.

Nonstop proteins are targeted for proteasomal degradation [25,26]. The yeast E3 ubiquitin ligase Ltn1 (Listerin in mammals) is associated with the 60S subunit and ubiquitinates peptidyl-tRNA, leading to the proteasomal degradation of nonstop products [27]. Recent studies focused on quality control of nonstop proteins revealed that the Ribosome Quality Control (RQC) complex promotes the ubiquitination and degradation of stalled nascent peptides in the 60S subunit [28,29]. Pelota-hHBS1 binds to the A-site of the stalled ribosomes and splits it into subunits. Listerin ubiquitinates the nascent polypeptide on the 60S subunit [28,29], and the AAA ATPase Cdc48, together with its cofactors, extracts the ubiquitinated peptidyl-tRNA for proteasomal degradation [28,29]. Defective Listerin in mouse neurons induces cell death [30], indicating that the degradation of arrest products plays a crucial role in ensuring the viability of neurons. Recent studies clearly showed that, during the reduction of ubiquitination or extraction of nascent chains, a carboxy-terminal alanine and threonine-containing extension (CAT-tail) is formed in an Rqc2-dependent manner [31]. The CAT-tail mediates protein aggregation, which causes proteotoxicity and induces a stress response. Taken together, these studies clearly suggest that the quality control systems for translation arrest play crucial roles in neurons, and probably in other cell types as well.

Here, we describe the conserved functions of hPelota in mRNA quality control induced by translation arrest in yeast. hPelota facilitated the expression of nonstop products from *GFP-Rz* mRNA by facilitating subunit dissociation of ribosomes that stall at the 3' end of *GFP-Rz* mRNA. Mutations in domain A of hPelota resulted in defective dissociation of stalled

ribosomes. The hPelota-R45A protein still associated with ribosomes with peptidyl-tRNA at the P-site, indicating that the R45A mutant is able to stably associate with the A-site but is defective in the dissociation of stalled ribosomes. hPelota promoted the degradation of *GFP-Rz* mRNA in the *dom34Δ* mutant and suppressed the sequential endonucleolytic cleavages caused by stalled ribosomes at the 3' end of mRNA in the *dom34Δ* mutant. These findings indicate that hPelota compensated for Dom34 functions in quality control of nonstop mRNA in yeast, suggesting that the roles of Dom34/hPelota in mRNA quality control by translation arrest are conserved.

Materials and methods

Strains and other methods

The strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. Northern and western blot analyses were performed as described previously [25]. *hPELO* and *hHBS1* were cloned by RT-PCR using total RNA from HEK293T cells. *Drosophila melanogaster PELO* was cloned by RT-PCR using total RNA from S2 cells.

Yeast extract and sucrose gradient separation

Yeast cells were grown exponentially at 30 °C and harvested by centrifugation. Cell extracts were prepared as described previously [25]. The equivalent of 50 A260 units were layered onto linear 10–50% sucrose density gradients. Sucrose gradients (10–50% sucrose in 10 mM Tris-acetate pH 7.4, 70 mM ammonium acetate, and 4 mM magnesium acetate) were prepared in polyallomer tubes (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using a Gradient Master. Crude extracts were layered on top of the sucrose gradients and centrifuged at $150\,000 \times g$ in a P28S rotor (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan) for 3 h at 4 °C. Gradients were then fractionated (TOWA laboratory, Tsukuba, Japan). Polysome profiles were generated by continuous measurement of absorbance at 254 nm using a single path UV-1 optical unit (AC-5200, ATTO Corporation, Tokyo, Japan) connected to a chart recorder (ATTO Corporation). Equal volume fractions were collected and processed for Northern or western blotting as described above.

Northern blotting using polyacrylamide gel

Total RNA was resolved by electrophoresis on 6% TBE-Urea polyacrylamide gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and then blotted onto Zeta-Probe GT Genomic Tested Blotting Membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell.

Determination of mRNA stability

Yeast cells were grown in minimal medium (SC medium) containing 2% galactose. Cells were grown to OD₆₀₀ = 0.6, harvested, and resuspended in medium containing 2% glucose to inhibit transcription from the *GALI* promoter. At the indicated times, the cells were harvested to prepare RNA samples using hot phenol. mRNA levels of reporter genes were determined by Northern blotting using digoxigenin (DIG)-labeled probes prepared by PCR-based nucleic acid labeling using commercial kits and the primers 5'-GCTCTAGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC-3' and 5'-GGACTAGTTTTGTATAGTTCATCATGCCA-3'. The *GFP G3* probe is a 5' end DIG-labeled oligonucleotide with the sequence 5'-TTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCAGTTACAACTCAAGAAGGACC-3'. The intensity of the bands on the blots was quantified on an ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Relative product levels were determined by comparison to a standard curve using a series of dilutions of samples from time 0 (just before the addition of glucose). The intensities of the bands from the diluted samples were compared to a standard curve, and the mRNA levels relative to control were determined.

Detection of peptidyl-tRNA

Cell extracts or polysome fractions were analyzed by PAGE at neutral pH (neutral-PAGE), followed by western blotting with anti-GFP antibodies. To destroy the RNA moiety of peptidyl-tRNA, RNase A was added to the samples at a final concentration of 10 mg·L⁻¹ and the samples were incubated at 37 °C for 10 min.

Results

hPelota facilitates the subunit dissociation of stalled ribosomes

We reported previously that the yeast Dom34-Hbs1 complex facilitates the dissociation of ribosomes stalled at the 3' ends of nonstop mRNAs *in vivo* [14]. In this study, we investigated whether hPelota could play a role in the dissociation of stalled ribosomes in yeast. *GFP-Rz* mRNA, which lacks a poly(A) tail and a termination codon, is produced from *GFP-Rz-FLAG-HIS3* mRNA by the self-cleavage activity of the hammerhead ribozyme (Rz). We expressed various levels of hPelota in *ski2Δdom34Δhbs1Δ* cells under the control of different promoters and compared the levels of peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* mRNA. The *GPD* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter was the strongest of the promoters used for expression (Fig. 1B), whereas the *CYC1* promoter

(Cytochrome c, isoform 1) was the weakest. Dom34 facilitates the dissociation of stalled ribosomes in concert with ABCE1. The subunit dissociation by Dom34-Hbs1 allows the peptidyl tRNA to become accessible to peptidyl tRNA hydrolases after it facilitates ribosome recycling and it is the hydrolases that separate the peptide and the tRNA. The peptidyl-tRNA produced from *GFP-Rz* mRNA could be detected in cell extracts of *ski2Δdom34Δhbs1Δ* mutants (Fig. 1B, lane 9). The levels of peptidyl-tRNA produced from *GFP-Rz* mRNA were relative to the expression levels of hPelota protein (Fig. 1B, lanes 5–8). To confirm the activity of hPelota in the subunit dissociation of stalled ribosomes leading to release of the peptide from peptidyl-tRNA, we detected peptidyl-tRNA from *GFP-Rz* by neutral-PAGE followed by western blotting. The peptidyl-tRNA produced from *GFP-Rz* could be detected in the monosome and polysome fractions of *ski2Δdom34Δhbs1Δ* mutant cells harboring *pCYC1p-hPELO* (Fig. 1C, top panel), but not in the extracts of cells expressing hPelota under the control of the *GPD* promoter (Fig. 1C, bottom panel). These findings indicate that hPelota facilitates the subunit dissociation of stalled ribosomes and release of the peptide from tRNA in yeast cells in proportion to the hPelota expression level. Moreover, peptide was released from peptidyl-tRNA in cells expressing *Drosophila melanogaster* Pelota (DmPelota) (Fig. 1D), indicating that the role of Dom34/Pelota in the dissociation of stalled ribosomes and release of peptide from peptidyl-tRNA derived from nonstop mRNA is conserved among eukaryotes.

Domain A of hPelota plays a crucial role following ribosome binding

A model of docking between the archaea Pelota-EF-1A complex (aPelota:aEF-1A) with the 80S ribosome suggested that domain A of Dom34 may interact with the ribosome-decoding center [32]. This idea was confirmed by cryo-EM of the Dom34-Hbs1 complex bound to the 80S ribosome showing that domain A of Dom34 interacts with the decoding center of the ribosome [33]. We previously reported Dom34 proteins with mutations in domain A, Dom34-K2A, Dom34-F47A, and Dom34-Δ(F47-T60) [14]. Dom34-F47A and Dom34-Δ(F47-T60), have almost no activity and exert dominant-negative effects on the activity of wild-type Dom34 [14]. The Dom34-K2A mutant is also defective, but still has residual activity [14]. We examined the roles of the corresponding residues of hPelota in release of the peptide from stalled ribosomes. The peptidyl-tRNAs from *GFP-Rz* were detected by western

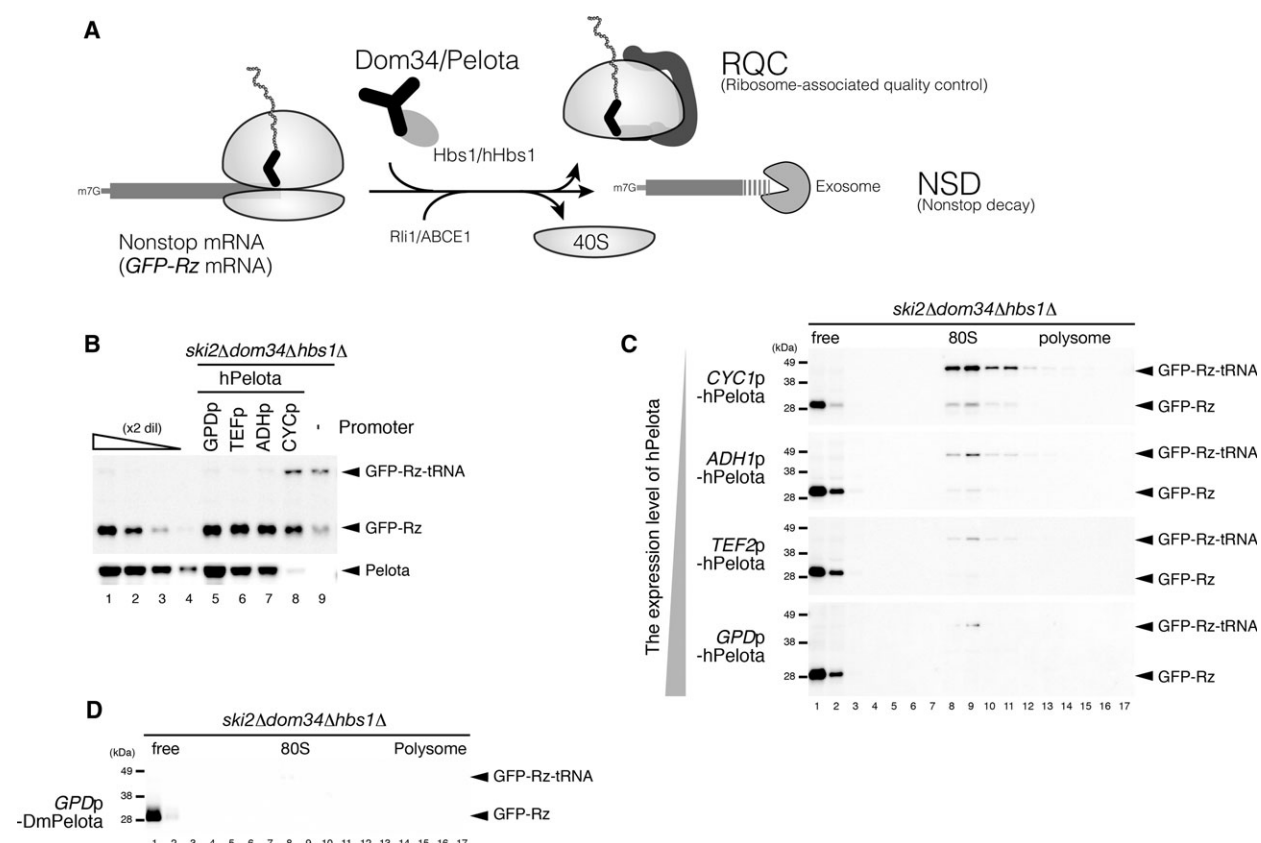


Fig. 1. hPelota facilitates peptide release of peptidyl-tRNA in stalled ribosomes at the 3' end of mRNA in yeast. (A) Quality control of ribosomes stalled at the 3' end of nonstop mRNA. In the ribosome-associated quality control (RQC) system, stalled ribosomes are dissociated into subunits via the activity of Dom34-Hbs1 in concert with Rli1, and the peptidyl-tRNA on the 60S subunit is ubiquitinated by Ltn1 to target it for proteasomal degradation. In NSD, Dom34-Hbs1 dissociates the stalled ribosome from nonstop mRNA, thereby facilitating the degradation of nonstop mRNA by the exosome. (B) Detection of peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* nonstop mRNA in *dom34Δ* mutant cells. *ski2Δdom34Δhbs1Δ* cells harboring *p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3* were cotransformed with the indicated hPelota-expressing plasmids. Cell extracts were analyzed by neutral-PAGE followed by western blotting using anti-GFP or anti-hPelota antibodies. (C) hPelota facilitates the subunit dissociation of ribosomes stalled at the 3' end of *GFP-Rz* mRNA. *ski2Δdom34Δhbs1Δ* cells harboring *p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3* were transformed with the indicated plasmids to express various levels of hPelota. Cell extracts were prepared, and polysome analysis was performed. Peptidyl-tRNAs derived from *GFP-Rz* mRNA were analyzed by neutral-PAGE followed by western blotting using an anti-GFP antibody. (D) The conserved function of Pelota in the release of stalled ribosomes lacking a termination codon. *ski2Δdom34Δhbs1Δ* cells harboring *p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3* were transformed with plasmids to express *Drosophila melanogaster* Pelota (DmPelota). Cell extracts were prepared and analyzed as described in (B).

blotting in *ski2Δdom34Δhbs1Δ* cells expressing the hPelota-K2A, -R45A, and -Δ(R45-R60) mutants (Fig. 2A, B), indicating that domain A of hPelota plays a crucial role in release of the peptide from stalled ribosomes. Ribosomes coimmunoprecipitated with both wild-type hPelota and the hPelota-R45A mutant proteins indicate that Pelota-R45A does interact with the 80S ribosome (Fig. 2C,D). Consistent with this, ribosomes that were affinity copurified with FLAG-tagged hPelota-R45A protein contained peptidyl-tRNA from *GFP-Rz* mRNA (Fig. 2E), suggesting that hPelota-R45A has a defect in a step that occurs after binding to the 80S ribosome.

hPelota functions in nonstop mRNA decay in yeast

Previous work showed that Dom34-Hbs1 stimulates degradation of nonstop mRNA from the 3' end [14]. hPelota promotes the dissociation of stalled ribosomes *in vitro* [21], and stimulates the degradation of nonstop mRNA in mammalian cells [15]. To determine whether hPelota facilitates the degradation of nonstop mRNA by dissociating the stalled ribosome from the mRNA, we examined its role in the degradation of *GFP-Rz* mRNA in yeast (Fig. 3A). *GFP-Rz* mRNA was significantly more stable when Dom34 and Hbs1 were absent from *xrn1Δ* mutant cells, in which only the 3'-to-5'

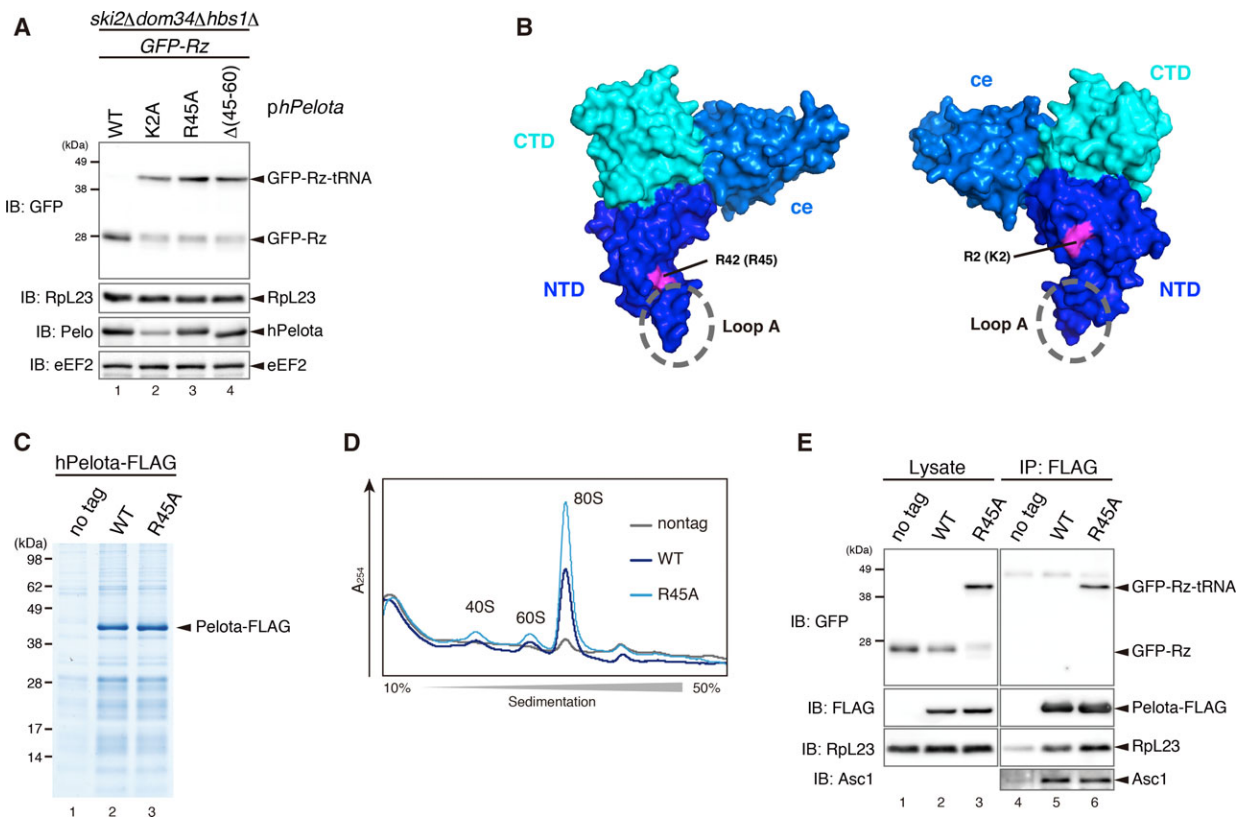


Fig. 2. Domain A of human Pelota plays a crucial role following ribosome binding. (A) *ski2Δdom34Δhbs1Δ* cells harboring *p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3* were transformed with the indicated plasmids to express mutants of hPelota. Cell extracts were prepared, and analyzed as described in Fig. 1. (B) The positions of the residues in hPelota or yeast Dom34 that are crucial for peptide release. Magenta indicates residues substituted to alanine in the N-terminal domain (NTD: blue) of hPelota. CTD; C-terminal domain, ce; central domain. These structural figures were prepared in PyMOL using PDB file 3WXM [32]. (C) Ribosomes were coimmunoprecipitated with hPelota or hPelota-R45A. SDS/PAGE analyses of affinity-purified samples from *dom34Δ* mutant cells expressing FLAG-tagged WT or R45A mutant hPelota proteins. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. (D) Sucrose gradient analysis of affinity-purified samples from *dom34Δ* mutant cells expressing nontagged hPelota (nontag), FLAG-tagged hPelota (WT), or hPelota-R45A mutant protein (R45A). (E) Detection of peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* nonstop mRNA in affinity-purified ribosomes with hPelota or hPelota-R45A. Affinity-purified samples in (C) were analyzed by neutral-PAGE followed by western blotting using an anti-GFP antibody.

degradation pathway is active ($t_{1/2} = 4.9$ min for *xrn1Δ* vs. $t_{1/2} > 32$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ*). *GFP-Rz* mRNA was significantly destabilized when hPelota was expressed in *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* mutant cells ($t_{1/2} > 32$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* vs. $t_{1/2} = 8.8$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* + hPelota). *GFP-Rz* mRNA was slightly significantly destabilized when hPelota and hHBS1 were expressed in *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* mutant cells ($t_{1/2} = 8.8$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* + hPelota vs. $t_{1/2} = 11.5$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* + hPelota, hHBS1). However, *GFP-Rz* mRNA was not destabilized when hPelota, hHBS1, and ABCE1 were expressed in *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* mutant cells ($t_{1/2} = 8.8$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* + hPelota vs. $t_{1/2} = 8.8$ min for *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* + hPelota, hHBS1, ABCE1). The levels of hPelota, hHbs1, and human

ABCE1 (hABCE1) proteins in the *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* mutant cells shown in Fig. 3A were confirmed by western blotting with anti-hPelota, anti-hHbs1, and anti-hABCE1 antibodies (Fig. 3B, lanes 4–6). These findings suggest that hPelota destabilizes *GFP-Rz* mRNA in yeast, probably by releasing stalled ribosomes from nonstop mRNA and facilitating access to the exosome.

hPelota functions in mRNA quality control induced by stalled ribosomes in yeast

Sequential endonucleolytic cleavages destabilize *GFP-Rz* mRNA in *dom34Δ* mutant cells [14] (Fig. 4A). Asc1/RACK1 is also required for the sequential endonucleolytic cleavages induced by the stalled

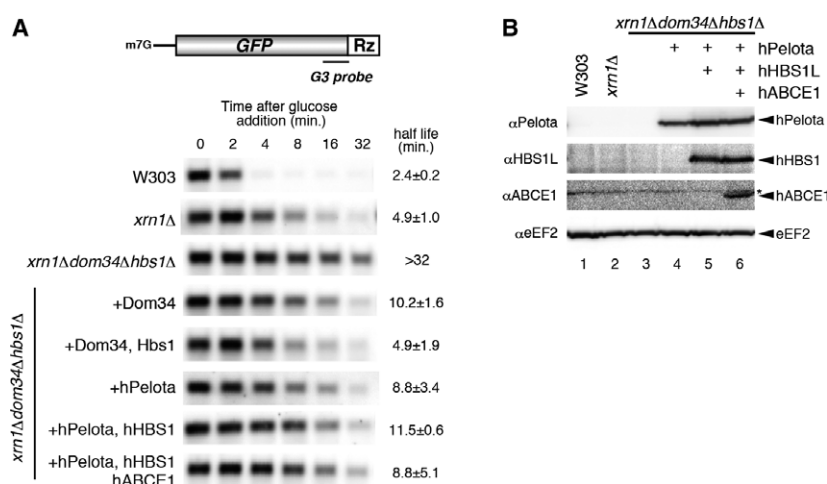


Fig. 3. Human Pelota (hPelota) facilitates the degradation of nonstop mRNA from the 3' end. (A) The Dom34-Hbs1 complex facilitates the degradation of GFP-Rz mRNA from the 3' end. (Top) A schematic drawing of GFP-Rz nonstop mRNA derived from the GFP-Rz-HIS3 reporter gene. GFP-Rz mRNA, which lacks a poly(A) tail and a termination codon, is produced from GFP-Rz-HIS3 mRNA by the self-cleavage activity of the hammerhead ribozyme (Rz). The DIG-labeled G3 probe corresponding to 654–714 nt of GFP is indicated. (Bottom) The stability of GFP-Rz mRNA in W303 (wild-type strain), *xrn1Δ*, and *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* mutant cells. Cells were grown in SC-Ura media containing 2% w/v galactose, and transcription was inhibited by addition of 2% w/v glucose at midlog phase. At the indicated times, cells were harvested, and the relative levels of GFP-Rz nonstop mRNA were determined by Northern blot analysis using the DIG-labeled G3 probe. The indicated plasmids expressing hPelota, human Hbs1 (hHbs1), or human ABCE1 (hABCE1) were introduced into *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* cells harboring p416GAL1p-GFP-Rz-HIS3. (B) The levels of hPelota, Hbs1, and ABCE1 proteins in *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* cells shown in (A). Protein samples were analyzed by western blotting using anti-hPelota or anti-hHbs1, anti-hABCE1, and anti-yeast eEF2 antibodies. The asterisk indicates a nonspecific band.

ribosome at the 3' end of GFP-Rz mRNA in *ski2Δ* *dom34Δ* mutant cells [34]. Upon expression of hPelota, the levels of fragments derived from GFP-Rz mRNA were drastically reduced in *dom34Δhbs1Δxrn1Δ* mutant cells (Fig. 4B, lanes 2–4). These findings indicate that hPelota facilitates the dissociation of ribosomes stalled at the 3' ends of GFP-Rz mRNA and inhibits the resultant sequential endonucleolytic cleavages in yeast cells.

Discussion

hPelota facilitates the subunit dissociation of stalled ribosomes

During translation elongation, the complex of EF-1A and aminoacyl-tRNA binds to the A-site of ribosome for decoding, and only the cognate aminoacyl-tRNA stimulates the GTPase activity of EF-1A, resulting in release of EF-1A. In contrast, a ribosome translating a nonstop mRNA stalls at the 3' end, and the stalled ribosome contains peptidyl-tRNA at the P-site but no mRNA at the A-site. Biochemical studies clearly demonstrate that the yeast Dom34-Hbs1 and hPelota-hHbs1 complexes preferentially bind to the empty A-site and dissociate the stalled ribosome [12,13,21]. Mutations in K2 or F47 of Dom34 diminished both

release of the peptide and degradation of nonstop mRNA [14]. The Dom34-F47A mutant was defective and dominantly inhibited wild-type Dom34 activity in yeast cells [14], suggesting that Dom34-F47A protein is not defective in binding to the ribosome A-site, but is defective in the subunit dissociation. In this study, we show that hPelota can complement the yeast *dom34* mutant and facilitate the subunit dissociation of ribosomes that are stalled at the 3' end of GFP-Rz mRNA (Fig. 2A). The K2 or R45 residues of hPelota, which correspond to the K2 or F47 of yeast Dom34, play crucial roles in the subunit dissociation activity of the protein (Fig. 2A). The hPelota-R45A mutant protein still associated with ribosomes containing peptidyl-tRNA from GFP-Rz mRNA (Fig. 2C–E), suggesting that the hPelota-R45A has a defect in a step that occurs after binding to the 80S ribosome. The R45 (R42 in archaea Pelota) residue is located in the neck of domain A (Fig. 2B), and may be important for inducing the proper conformational change, depending on recognition of the decoding center by loop A. We propose that proper interaction between domain A of Dom34/hPelota and the ribosome-decoding center is crucial for the subunit dissociation of ribosomes that are stalled at the 3' end that leads to the termination codon-independent peptide release.

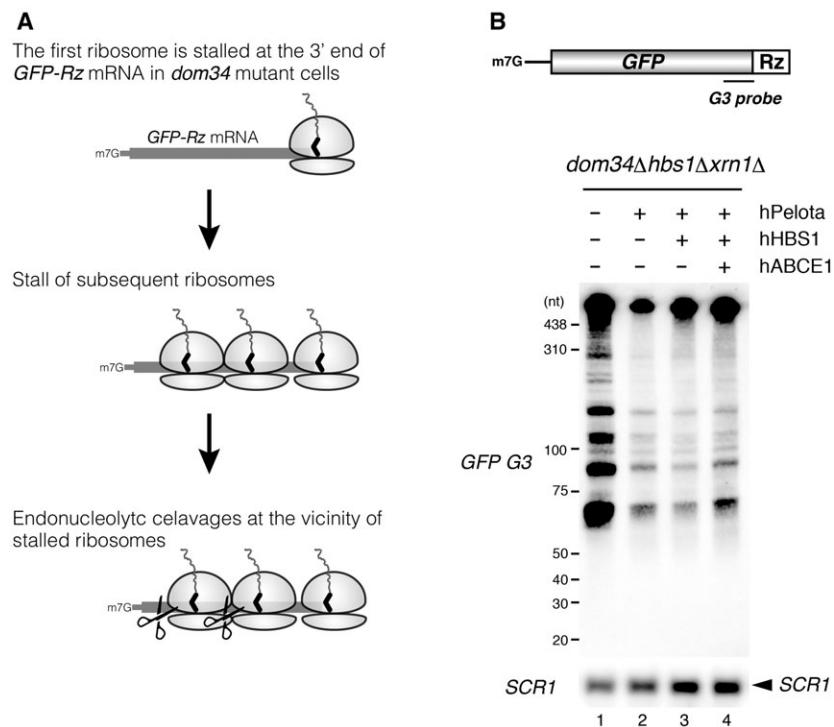


Fig. 4. hPelota suppresses multiple endonucleolytic cleavages of *GFP-Rz* mRNA in the *dom34Δ* mutant background. (A) A model for quality control of ribosomes stalled at the 3' ends of nonstop mRNAs in the *dom34Δ* mutant. In the absence of Dom34, a stalled ribosome at the 3' end of a nonstop mRNA induces sequential cleavage, resulting in the production of a ladder of small fragments protected by ribosomes. (B) Cells harboring *xrn1Δdom34Δhbs1Δ* were transformed with the indicated plasmids expressing hPelota, hHBS1, or hABCE1. RNA samples were prepared from the indicated cells harboring *p416GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3* and analyzed by 6% TBE-Urea PAGE and Northern blotting using a DIG-labeled *G3* probe.

hPelota functions in quality control of nonstop mRNA in yeast

Our results indicate that hPelota facilitates the degradation of *GFP-Rz* mRNA that lacks a termination codon and a poly(A) tail (Fig. 3A). In *dom34Δ* mutant cells, ribosomes stalled at the 3' ends of nonstop mRNA induce sequential endonucleolytic cleavages [14]. hPelota facilitates the release of stalled ribosomes, thereby suppressing these sequential endonucleolytic cleavages (Fig. 4B). Asc1 is also required for quality control mechanisms induced by translation arrest [35–40]. Recently, we reported that ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for the endonucleolytic cleavage of nonstop mRNA by stalled ribosomes in the absence of Dom34 [34]. Ribosome-associated Asc1/RACK1 facilitates the endonucleolytic cleavage of nonstop mRNA induced by stalled ribosomes and represses the levels of aberrant products even in the absence of Dom34. We propose that Asc1/RACK1 acts as a fail-safe in quality control for nonstop mRNA. It is important to examine if this role of RACK1 is conserved in higher eukaryotes.

Dom34 and Rli1 are also crucial for ribosome recycling at the 3'-UTR of mRNA. The results presented in this study suggest that hPelota targets arrested ribosomes near the end of the 3'-UTR as well as at the 3' end of nonstop mRNA. It is crucial to investigate whether the roles of Dom34-Hbs1 and ABCE1 in ribosome recycling at the 3'-UTR are conserved in higher eukaryotes.

Physiological roles of hPelota and quality controls

Pelota plays crucial roles in the germline. Pelota is required for meiotic cell division in *Drosophila* spermatogenesis [41], and for early embryonic viability and cell cycle progression [42]. Pelota also controls the self-renewal of germline stem cells [43], and regulates the development of extraembryonic endoderm and epidermal differentiation [44,45]. Pelota mediates gonocyte maturation and maintenance of spermatogonial stem cells in mouse testes [46]. Besides roles in the germline, *Drosophila* Pelota and Hbs1 are required for

transposon silencing in the *Drosophila* germline [47], and for high efficiency viral replication [48]. Pelota also controls resistance to begomovirus in plants [49]. Recent work revealed that defects in *GTPBP2*, a Pelota-binding partner in mammals, cause ribosome stalling in a tRNA_{Arg}(UCU) mutant background, resulting in the death of mouse neurons [50,51]. Perturbation of translation products, an increase in the level of aberrant proteins, or a reduction in the level of full-length products could induce cell death. Alternatively, the stalled ribosome itself may trigger the signaling pathway that induces cell death. The underlying mechanisms that cause the defects observed in the mutants of Pelota or its GTP-binding partners remain largely unknown, and translation defects in these mutants need to be analyzed precisely and extensively to understand the roles of the conserved complex in gene expression and quality control.

Acknowledgements

We thank members of our laboratories for discussion and critical comments on the manuscript. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science (grant number 26291002 and 26116003), and by Research Grants in the Natural Sciences from the Takeda Foundation (to T.I.). K.I. was a recipient of a JSPS Research Fellowship.

Author contributions

KI, KK, and EY performed experiments. TI designed the study and performed data analysis. KI and TI wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

References

- Schweingruber C, Rufener SC, Zund D, Yamashita A and Muhlemann O (2013) Nonsense-mediated mRNA decay – mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 612–623.
- Schoenberg DR and Maquat LE (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* **13**, 246–259.
- Shao S and Hegde RS (2016) Target selection during protein quality control. *Trends Biochem Sci* **41**, 124–137.
- Shoemaker CJ and Green R (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 594–601.
- Parker R (2012) RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671–702.
- Inada T (2013) Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 634–642.
- Hilal T and Spahn CM (2015) Ribosome rescue and protein quality control in concert. *Mol Cell* **57**, 389–390.
- Brandman O and Hegde RS (2016) Ribosome-associated protein quality control. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 7–15.
- van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC and Parker R (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**, 2262–2264.
- Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrero AL, Parker R and Dietz HC (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258–2261.
- Doma MK and Parker R (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564.
- Shoemaker CJ, Eyler DE and Green R (2010) Dom34: Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* **330**, 369–372.
- Shoemaker CJ and Green R (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, E1392–E1398.
- Tsuboi T, Kuroha K, Kudo K, Makino S, Inoue E, Kashima I and Inada T (2012) Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell* **46**, 518–529.
- Saito S, Hosoda N and Hoshino SI (2013) Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells. *J Biol Chem* **288**, 17832–17843.
- Passos DO, Doma MK, Shoemaker CJ, Muhlrads D, Green R, Weissman J, Hollien J and Parker R (2009) Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Mol Biol Cell* **20**, 3025–3032.
- Chen L, Muhlrads D, Hauryliuk V, Cheng Z, Lim MK, Shyp V, Parker R and Song H (2010) Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1233–1240.
- van den Elzen AM, Henri J, Lazar N, Gas ME, Durand D, Lacroute F, Nicaise M, van Tilbeurgh H, Seraphin B and Graille M (2010) Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1446–1452.
- van den Elzen AM, Schuller A, Green R and Seraphin B (2014) Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. *EMBO J* **33**, 265–276.
- Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CU and

- Pestova TV (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell* **37**, 196–210.
- 21 Pisareva VP, Skabkin MA, Hellen CU, Pestova TV and Pisarev AV (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J* **30**, 1804–1817.
 - 22 Kashima I, Takahashi M, Hashimoto Y, Sakota E, Nakamura Y and Inada T (2014) A functional involvement of ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochimie* **106**, 10–16.
 - 23 Guydosh NR and Green R (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell* **156**, 950–962.
 - 24 Young DJ, Guydosh NR, Zhang F, Hinnebusch AG and Green R (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'UTRs in vivo. *Cell* **162**, 872–884.
 - 25 Inada T and Aiba H (2005) Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J* **24**, 1584–1595.
 - 26 Ito-Harashima S, Kuroha K, Tatematsu T and Inada T (2007) Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev* **21**, 519–524.
 - 27 Bengtson MH and Joazeiro CA (2010) Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* **467**, 470–473.
 - 28 Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong D, Larson A, Williams CC, Li GW, Zhou S, King D, Shen PS, Weibezahn J *et al.* (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042–1054.
 - 29 Defenouillere Q, Yao Y, Mouaikel J, Namane A, Galopier A, Decourty L, Doyen A, Malabat C, Saveanu C, Jacquier A *et al.* (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 5046–5051.
 - 30 Chu J, Hong NA, Masuda CA, Jenkins BV, Nelms KA, Goodnow CC, Glynne RJ, Wu H, Masliah E, Joazeiro CA *et al.* (2009) A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 2097–2103.
 - 31 Shen PS, Park J, Qin Y, Li X, Parsawar K, Larson MH, Cox J, Cheng Y, Lambowitz AM, Weissman JS *et al.* (2015) Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* **347**, 75–78.
 - 32 Kobayashi K, Kikuno I, Kuroha K, Saito K, Ito K, Ishitani R, Inada T and Nureki O (2010) Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1alpha complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 17575–17579.
 - 33 Becker T, Franckenberg S, Wickles S, Shoemaker CJ, Anger AM, Armache JP, Sieber H, Ungewickell C, Berninghausen O, Daberkow I *et al.* (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**, 501–506.
 - 34 Ikeuchi K and Inada T (2016) Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci Rep* **6**, 28234.
 - 35 Kuroha K, Akamatsu M, Dimitrova L, Ito T, Kato Y, Shirahige K and Inada T (2010) Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* **11**, 956–961.
 - 36 Matsuda R, Ikeuchi K, Nomura S and Inada T (2014) Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells* **19**, 1–12.
 - 37 Wolf AS and Grayhack EJ (2015) Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA* **21**, 935–945.
 - 38 Thompson MK, Rojas-Duran MF, Gangaramani P and Gilbert WV (2016) The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *Elife* **5**, e11154.
 - 39 Letzring DP, Dean KM and Grayhack EJ (2010) Control of translation efficiency in yeast by codon-anticodon interactions. *RNA* **16**, 2516–2528.
 - 40 Letzring DP, Wolf AS, Brule CE and Grayhack EJ (2013) Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA* **19**, 1208–1217.
 - 41 Eberhart CG and Wasserman SA (1995) The pelota locus encodes a protein required for meiotic cell division: an analysis of G2/M arrest in *Drosophila* spermatogenesis. *Development* **121**, 3477–3486.
 - 42 Adham IM, Sallam MA, Steding G, Korabiowska M, Brinck U, Hoyer-Fender S, Oh C and Engel W (2003) Disruption of the pelota gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **23**, 1470–1476.
 - 43 Xi R, Doan C, Liu D and Xie T (2005) Pelota controls self-renewal of germline stem cells by repressing a Bam-independent differentiation pathway. *Development* **132**, 5365–5374.
 - 44 Nyamsuren G, Kata A, Xu X, Raju P, Dressel R, Engel W, Pantakani DV and Adham IM (2014) Pelota regulates the development of extraembryonic endoderm through activation of bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *Stem Cell Res* **13**, 61–74.
 - 45 Elkenani M, Nyamsuren G, Raju P, Liakath-Ali K, Hamdaoui A, Kata A, Dressel R, Klonisch T, Watt

- FM, Engel W *et al.* (2016) Pelota regulates epidermal differentiation by modulating BMP and PI3K/AKT signaling pathways. *J Invest Dermatol* **136**, 1664–1671.
- 46 Raju P, Nyamsuren G, Elkenani M, Kata A, Tsagaan E, Engel W and Adham IM (2015) Pelota mediates gonocyte maturation and maintenance of spermatogonial stem cells in mouse testes. *Reproduction* **149**, 213–221.
- 47 Yang F, Zhao R, Fang X, Huang H, Xuan Y, Ma Y, Chen H, Cai T, Qi Y and Xi R (2015) The RNA surveillance complex Pelo-Hbs1 is required for transposon silencing in the *Drosophila* germline. *EMBO Rep* **16**, 965–974.
- 48 Wu X, He WT, Tian S, Meng D, Li Y, Chen W, Li L, Tian L, Zhong CQ, Han F *et al.* (2014) pelo is required for high efficiency viral replication. *PLoS Pathog* **10**, e1004034.
- 49 Lapidot M, Karniel U, Gelbart D, Fogel D, Evenor D, Kutsher Y, Makhbash Z, Nahon S, Shlomo H, Chen L *et al.* (2015) A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota. *PLoS Genet* **11**, e1005538.
- 50 Ishimura R, Nagy G, Dotu I, Zhou H, Yang XL, Schimmel P, Senju S, Nishimura Y, Chuang JH and Ackerman SL (2014) RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. *Science* **345**, 455–459.
- 51 Kirmizitas A, Gillis WQ, Zhu H and Thomsen GH (2014) Gtpbp2 is required for BMP signaling and mesoderm patterning in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **392**, 358–367.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. Yeast strains and plasmids used in this study.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA

Received: 15 February 2016

Accepted: 31 May 2016

Published: 17 June 2016

Ken Ikeuchi & Toshifumi Inada

Dom34-Hbs1 stimulates degradation of aberrant mRNAs lacking termination codons by dissociating ribosomes stalled at the 3' ends, and plays crucial roles in Nonstop Decay (NSD) and No-Go Decay (NGD). In the *dom34Δ* mutant, nonstop mRNA is degraded by sequential endonucleolytic cleavages induced by a stalled ribosome at the 3' end. Here, we report that ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for the endonucleolytic cleavage of nonstop mRNA by stalled ribosome at the 3' end of mRNA in *dom34Δ* mutant cells. Asc1/RACK1 facilitates degradation of truncated *GFP-Rz* mRNA in the absence of Dom34 and exosome-dependent decay. Asc1/RACK1 is required for the sequential endonucleolytic cleavages by the stalled ribosome in the *dom34Δ* mutant, depending on its ribosome-binding activity. The levels of peptidyl-tRNA derived from nonstop mRNA were elevated in *dom34Δasc1Δ* mutant cells, and overproduction of nonstop mRNA inhibited growth of mutant cells. E3 ubiquitin ligase Ltn1 degrades the arrest products from truncated *GFP-Rz* mRNA in *dom34Δ* and *dom34Δasc1Δ* mutant cells, and Asc1/RACK1 represses the levels of substrates for Ltn1-dependent degradation. These indicate that ribosome-associated Asc1/RACK1 facilitates endonucleolytic cleavage of nonstop mRNA by stalled ribosomes and represses the levels of aberrant products even in the absence of Dom34. We propose that Asc1/RACK1 acts as a fail-safe in quality control for nonstop mRNA.

Systems for quality control of aberrant mRNAs prevent production of potentially harmful protein products by repressing translation and promoting protein degradation and stimulating mRNA degradation^{1–5}. No-Go Decay (NGD) of mRNA, which is triggered by blockage of translation during the elongation step, induces the endonucleolytic cleavage in the vicinity of the stalled site^{6–10}. This cleavage results in the production of two mRNA fragments, a 5'-NGD intermediate and a 3'-NGD intermediate, which are further degraded by the exosome and Xrn1 exonuclease, respectively. The 5'-NGD intermediate lacks a termination codon, and a ribosome translating a 5'-NGD intermediate may be stalled at the 3' end. For a 5'-NGD intermediate to be rapidly degraded by the exosome, the stalled ribosome at the 3' end of the mRNA fragment must be dissociated.

Dom34-Hbs1 has been proposed to be involved in the endonucleolytic cleavage of mRNA induced by blockage of translation elongation *in vivo*^{6,7,9–11}. Recent biochemical analyses clearly demonstrated that yeast Dom34-Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off^{12,13}. In yeast *in vitro* reconstituted translation system, Dom34-Hbs1 promotes the dissociation of the translation elongation complex into subunits, release of mRNA, and drop-off of peptidyl-tRNA^{12,13}. Mammalian Pelota-human Hbs1 (hHbs1) also induces the dissociation of the translation elongation complex, but only in the presence of ABCE1, and Hbs1 has only a stimulatory effect¹⁴. A recent study showed that the yeast Dom34-Hbs1 complex dissociates a ribosome stalled at the 3' end of a 5'-NGD intermediate and stimulates the exosomal degradation of the 5'-NGD intermediate *in vivo*¹⁰. The Nonstop Decay (NSD) quality control system eliminates nonstop mRNA, and Dom34-Hbs1 also facilitates the degradation of nonstop mRNAs from their 3' ends by exosome^{10,15}. These results indicate that the Dom34-Hbs1 complex plays a crucial role in both NGD and NSD by stimulating the degradation of this mRNA by dissociating the ribosome

Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.I. (email: tinada@m.tohoku.ac.jp)

that is stalled at the 3' end of nonstop mRNA. In *dom34Δ* mutant cells, a stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA may inhibit the degradation of nonstop mRNA by exosomes but induce sequential endonucleolytic cleavages. The mechanisms and physiological roles of sequential cleavages induced by stalled ribosome still remain elusive.

Nascent peptide-dependent translation arrest is crucial for quality control of eukaryotic gene expression. A genetic screen to identify factors required for induction of translation arrest by poly-arginine sequences revealed that *RACK1* (*ASC1* in yeast) is required for translation arrest⁹. *Asc1/RACK1*, which is highly conserved in eukaryotes, serves as a scaffold protein in many different signal transduction pathways. It also functions in developmental processes, such as sexual differentiation, cell-proliferation control, control of post-synaptic excitation in the brain and in hormone response pathways^{16–19}. *Asc1/RACK1* stably associates with the 40S subunit in a stoichiometric manner in yeast^{20–22}. However, its role in translational control is still largely unknown. Two important questions to be resolved are how *Asc1/RACK1* functions during translation arrest; how it can sense the properties of the nascent peptide in the ribosomal tunnel on the 60S subunit. Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) structure of yeast ribosome revealed that the structure of the 60S subunit is affected by *Asc1/RACK1* depletion^{23,24}. Crystal structure studies showed that *RACK1* binds to the head region of the 40S subunit in the vicinity of the mRNA exit channel^{21,22}. These suggest that binding of *Asc1/RACK1* to the 40S subunit stabilizes the conformation and/or the monitoring of the properties of nascent peptide in the ribosome tunnel by the 80S ribosome. It is also possible that recruitment of signaling factors through interactions with *Asc1/RACK1* on the 40S subunit are required to modulate the activity of the ribosome or translation factors. A recent study showed that *Asc1/RACK1* inhibits ribosomal +1 frameshifting at tandem CGA rare codons²⁵. These findings suggest that *Asc1/RACK1* may also modulate translation elongation at specific sites, implying that it plays an important and so far unappreciated role in the control of gene expression in eukaryotes.

Here, we describe the mechanism and biological relevance of a novel quality control system induced by stalled ribosomes at the 3' end of mRNA. *Asc1/RACK1* stimulated the degradation of truncated *GFP-Rz* mRNA that lacks both a termination codon and a poly(A) tail in *dom34Δasc1Δ* mutant cells. The sequential endonucleolytic cleavages by stalled ribosomes at the 3' end of mRNA were drastically decreased by the deletion of *ASC1/RACK1*. Small fragments of truncated *GFP-Rz* mRNA were purified with stalled ribosomes in an *Asc1/Rack1* dependent manner. Overproduction of nonstop mRNA inhibited the growth of the *dom34Δasc1Δ* mutant, possibly due to the elevated level of peptidyl-tRNA derived from truncated *GFP-Rz* mRNA. Moreover, the level of the peptidyl-tRNA was drastically increased by the deletion of *Asc1/RACK1* in *dom34Δ* mutant background. Finally, we found that arrest products from truncated *GFP-Rz* mRNA in *asc1Δ* and *dom34Δ* mutant cells were degraded by *Ltn1* that is an E3 ubiquitin ligase for co-translational degradation of arrest products. Based on our findings, we propose that *Asc1/RACK1* stalls ribosome during aberrant translation elongation to induce endonucleolytic cleavages thereby reducing the level of aberrant mRNAs.

Results

***Asc1/RACK1* facilitates the degradation of truncated *GFP-Rz* mRNA in the *dom34Δ* mutant background.** Previous work showed that *Dom34-Hbs1* stimulates degradation of nonstop mRNA from the 3' end¹⁰ (Fig. 1A). To determine whether *Asc1/RACK1* is involved in NSD, we examined its role in the degradation of *GFP-Rz* mRNA in the absence of *Dom34* (Fig. 1B). *GFP-Rz* mRNA is produced from *GFP-Rz-FLAG-HIS3* mRNA by the self-cleavage activity of hammerhead ribozyme(Rz), therefore this mRNA lacks a poly(A) tail and a termination codon. As previously reported, *GFP-Rz* mRNA was significantly more stable when *Dom34* and *Hbs1* were absent from the *xrn1Δ* mutant, in which only the 3'-to-5' degradation pathway is active¹⁰ (Fig. 1B, $t_{1/2} = 4.9$ min. for *xrn1Δ* vs. $t_{1/2} = 27.6$ min. for *xrn1Δdom34Δ*). We found that *Asc1/RACK1* destabilized *GFP-Rz* mRNA in the absence of *Dom34* (Fig. 1B, $t_{1/2} = 4.1$ min. for *dom34Δ* vs. $t_{1/2} = 7.0$ min. for *dom34Δasc1Δ*). *Asc1/RACK1* also destabilized *GFP-Rz* mRNA in *ski2Δdom34Δ* mutant background (Fig. 1B, $t_{1/2} = 5.0$ min. for *ski2Δdom34Δ* vs. $t_{1/2} > 32$ min. for *asc1Δski2Δdom34Δ*). These indicate that *Asc1/RACK1* facilitates truncated *GFP-Rz* mRNA decay in the absence of exosome-dependent decay and *Dom34*.

***Asc1/RACK1* is required for endonucleolytic cleavage of truncated *GFP-Rz* mRNA in the *dom34Δ* mutants.** We previously reported that *Asc1/RACK1* is involved in NGD, endonucleolytic cleavage induced by translation arrest⁹. Therefore, we hypothesized that sequential endonucleolytic cleavages destabilize *GFP-Rz* mRNA in *ski2Δdom34Δ* mutant cells, and *Asc1/RACK1* is required for the sequential endonucleolytic cleavages induced by the stalled ribosome at the 3' end of *GFP-Rz* mRNA in *ski2Δdom34Δ* mutant cells. To test the possibility that *Asc1/RACK1* is required for the sequential endonucleolytic cleavages induced by the stalled ribosome, we determined the levels of 40–200 nt fragments derived from *GFP-Rz* reporter mRNAs by Northern blot analysis, as previously described¹⁰ (Fig. 2A). Upon deletion of *ASC1/RACK1*, the levels of fragments derived from *GFP-Rz* mRNA were drastically reduced in *dom34Δ* mutant cells (Fig. 2B, lanes 8 and 9), *ski2Δdom34Δ* mutant cells (Fig. 2B, lanes 10 and 11) or *xrn1Δdom34Δ* mutant cells (Fig. 2B, lanes 12 and 13). Deletion of *ASC1/RACK1* diminished the production of fragments in *ski2Δdom34Δ* and *xrn1Δdom34Δ* mutant cells (Fig. 2C). These findings indicate that *Asc1/RACK1* is generally required for the sequential endonucleolytic cleavages induced by stalled ribosomes at the 3' ends of mRNA.

Small fragments of truncated *GFP-Rz* mRNA were purified with stalled ribosomes in an *Asc1/Rack1* dependent manner. To confirm that stalled ribosome at the 3' end of mRNA in *dom34Δ* mutant cells contains small RNA fragments, we purified stalled ribosomes from cells expressing both Protein A-TEV-*GFP-Rz* and *Rps2-FLAG* proteins as depicted in Fig. 3A. The Protein A-TEV-*GFP-Rz* truncated products derived from *GFP-Rz* truncated mRNA were purified with IgG affinity beads and eluted by the addition of TEV protease. Then stalled ribosomes were affinity-purified with anti-FLAG resin. The stalled ribosomes containing

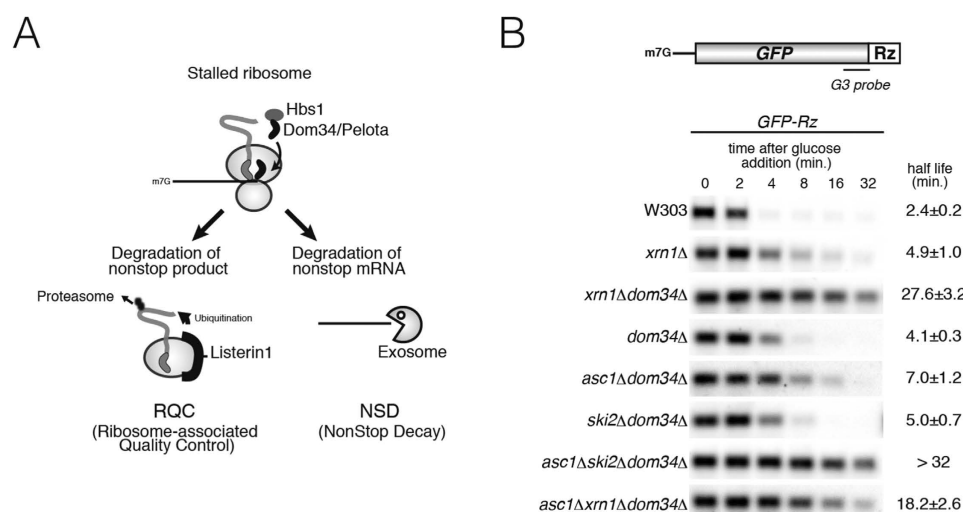


Figure 1. Ascl/RACK1 facilitates truncated GFP-Rz mRNA decay in the absence of 5'- to -3' decay pathway. (A) Quality control of ribosome stalled at the 3' end of truncated GFP-Rz mRNA. In the ribosome-associated quality control (RQC) system, a stalled ribosome dissociates into subunits by the functions of Dom34-Hbs1 in concert with Rli1, and the peptidyl-tRNA on the 60S subunit is ubiquitinated by Ltn1 Listerin in mammal to target it for proteasomal degradation. In NSD, Dom34-Hbs1 dissociates the stalled ribosome from nonstop mRNA, thereby facilitating degradation of nonstop mRNA by the exosome. (B) Ascl/RACK1 facilitates degradation of GFP-Rz mRNA in the absence of Dom34. (Top) Schematic drawing of truncated GFP-Rz mRNA derived from the GFP-Rz-FLAG-HIS3 reporter gene. GFP-Rz mRNA, which lacks a poly(A) tail and a termination codon, is produced from GFP-Rz-FLAG-HIS3 mRNA by the self-cleavage activity of hammerhead ribozyme (Rz). DIG-labeled G3 probe corresponding to 654–714 nt of GFP is indicated. (Bottom) The stability of GFP-Rz mRNA in the indicated mutant cells. Cells were grown in SC-Ura media containing 2%w/v galactose, and transcription was inhibited by addition of 2%w/v glucose at mid-log phase. At the indicated times, cells were harvested, and the relative levels of truncated GFP-Rz mRNA were determined by Northern blot analysis using a DIG-labeled G3 probe.

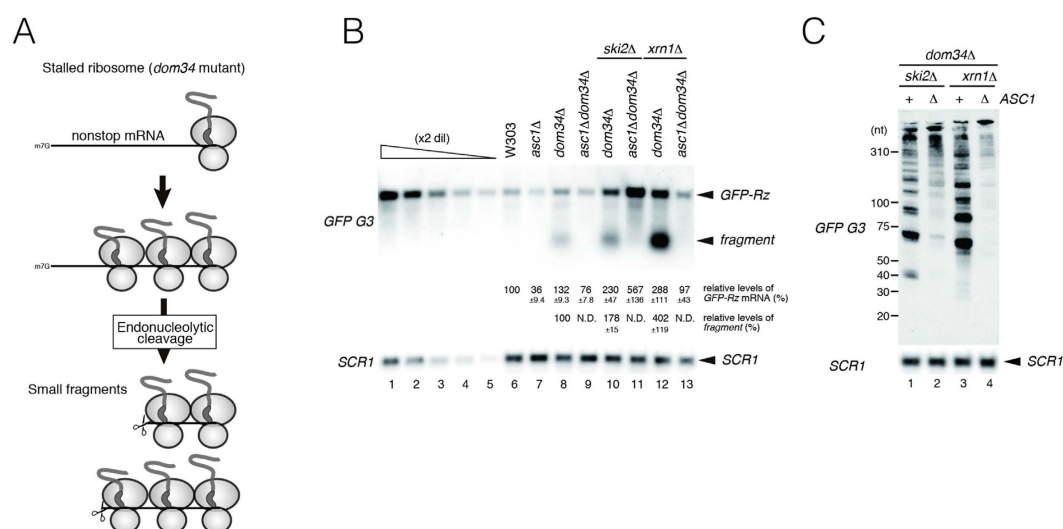


Figure 2. Ascl/RACK1 is required for sequential endonucleolytic cleavages induced by stalled ribosomes. (A) Multiple endonucleolytic cleavages of truncated GFP-Rz mRNA in the *dom34Δ* mutant background. (B) Ascl/RACK1 is required for multiple endonucleolytic cleavages of GFP-Rz mRNA induced by stalled ribosomes. RNA samples were prepared from the indicated cells harboring p416GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 and analyzed by 1.2% agarose and Northern blotting using DIG-labeled G3 and SCR1 probes. The levels of GFP-Rz mRNA and fragments were determined using the samples from *ski2Δdom34Δasc1Δ* cells harboring p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3 as a standard curve (lanes 1–5). The relative levels of each mRNA or fragments were normalized with respect to the GFP-Rz mRNA level in wild-type cells, which was assigned a value of 100, and reported as the mean values from three independent experiments. (C) Ascl/RACK1 is required for multiple endonucleolytic cleavages of GFP-Rz mRNA induced by stalled ribosomes. RNA samples were prepared from the indicated cells harboring p416GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 and analyzed by 6% TBE-Urea PAGE and Northern blotting using DIG-labeled G3 and SCR1 probes.

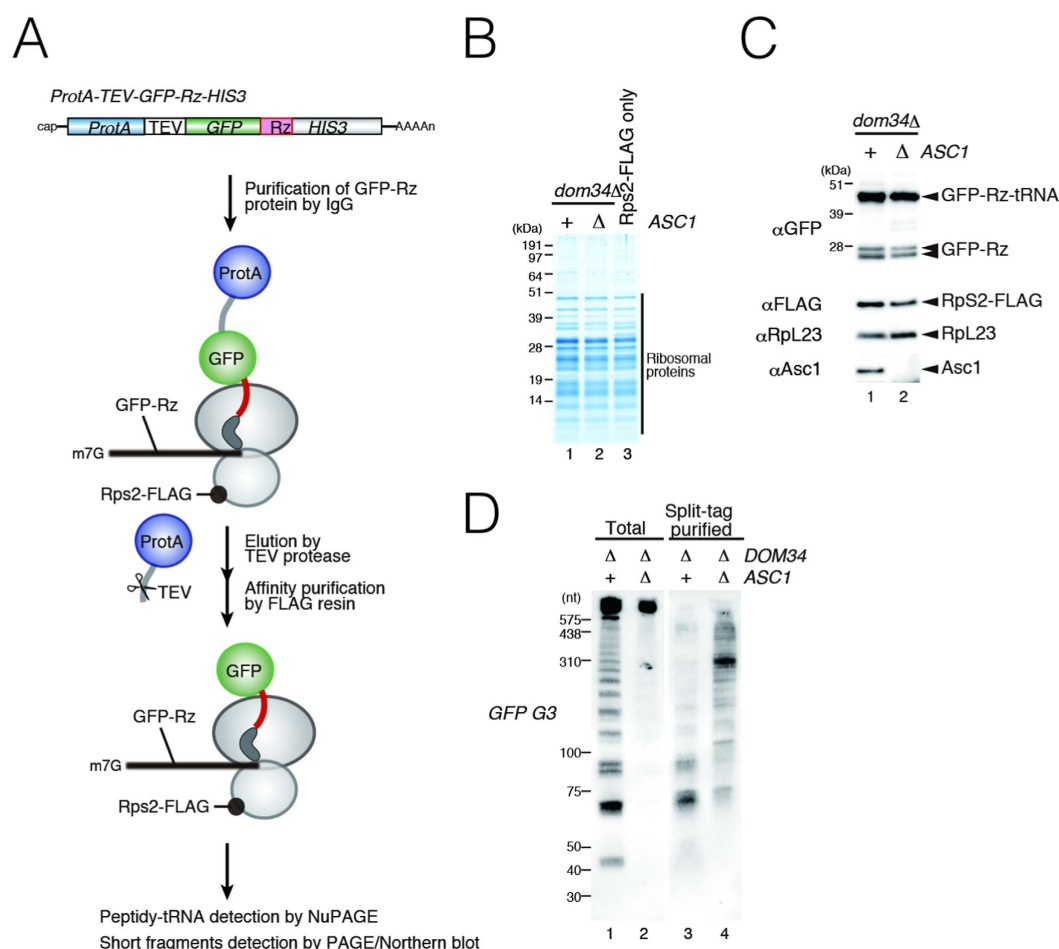


Figure 3. Purification of stalled ribosome at the 3' end of GFP-Rz truncated mRNA. (A) Schematic illustration of the split-tag affinity purification of the stalled ribosome. (B) Cells harboring pGPDp-*ProtA-TEV-GFP-Rz-HIS3* were harvested and cell lysates prepared for split-tag purification. Protein samples of the purified fractions were analyzed by CBB stain (lanes 1–2). Ribosomes were affinity-purified from Rps2-FLAG cells as a control (lane 3). (C) Protein samples of the purified fractions were analyzed by NuPAGE followed by Western blot analysis with anti-GFP antibody (Top panel) or anti-FLAG, anti-Rpl23 and anti-Asc1 antibodies (Bottom panels). (D) RNA samples of the purified fractions were analyzed by Northern blotting using DIG-labeled G3 probes after PAGE.

peptidyl-tRNA were purified from both *dom34Δ* mutant and *asc1Δdom34Δ* mutant cells with this (Fig. 3B,C). Northern blot analysis of the purified samples with *GFP G3* probe clearly revealed that the purified stalled ribosomes from *dom34Δ* cells contain fragments derived from *GFP-Rz* mRNA (Fig. 3D, lane 3). In contrast, stalled ribosomes from *asc1Δdom34Δ* cells contain less amounts of small fragments derived from *GFP-Rz* mRNA, and the levels of fragments were the same as that from *dom34Δ* mutant cells (Fig. 3D). These results clearly indicate that stalled ribosomes at the 3' end of *GFP-Rz* mRNA in *dom34Δ* mutant cells contain fragments produced by sequential endonucleolytic cleavages in an Asc1/RACK1-dependent manner.

An endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome requires ribosome-associated Asc1/RACK1.

We previously reported that Asc1/RACK1 participates in nascent peptide-dependent translation arrest, and that the binding of Asc1/RACK1 to the 40S subunit is crucial for this translation arrest. The *asc1D109Y* and *asc1R38DK40E* mutants were found to produce severe defects both in translation repression by polybasic sequence and in the association between RACK1 and the ribosome⁹. We introduced mutations in residues located at the sites of interaction of Asc1/RACK1 with the 40S subunit²⁶ (Fig. 4A, pink residues). We determined the levels of the full-length products derived from *GFP-R12-FLAG-HIS3* (R12) reporter, and three Asc1/RACK1 mutant proteins (16HNG18AAA, 38RDK40AAA and 85WDK87AAA) were defective in translation arrest induced by a polybasic amino-acid sequence (Fig. 4B). Western blot analysis followed by centrifugation in sucrose density gradients revealed that these three Asc1/RACK1 mutant proteins (16HNG18AAA, 38RDK40AAA and 85WDK87AAA) were defective in interaction with ribosome (Fig. 4C). These results are consistent with previous results showing that the binding of Asc1/RACK1 to the 40S subunit is crucial for translation arrest induced by polybasic sequence⁹. We next examined whether the 40S subunit binding of Asc1/RACK1 is crucial for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. Production of fragments was diminished in *ski2Δdom34Δ* and *xrn1Δdom34Δ* mutant cells expressing these Asc1/RACK1

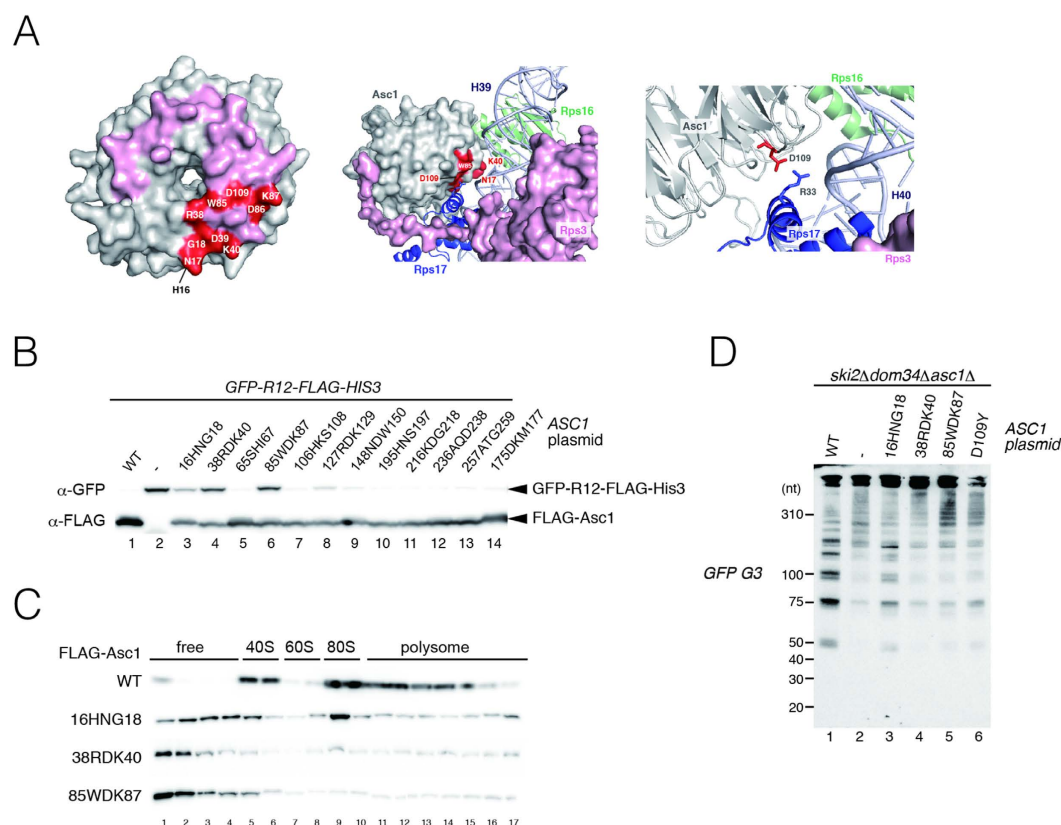


Figure 4. Ribosome binding activity of Asc1/RACK1 is required for sequential endonucleolytic cleavages induced by stalled ribosomes. (A) The structure diagram was prepared in PyMOL using PDB file 4V88. (Left) Residues located in the putative interaction sites of Asc1/RACK1 with the 40S subunit are shown in pink. Residues replaced with alanine residues in mutants defective in translation arrest by polybasic sequence and the interaction with 40S subunit were shown in Red. (Middle) The residues involved in translation arrest by polybasic sequence and the interaction with 40S subunit locate close to H39-H40 and Rps17. (Right) Relative position of D109 of Asc1 to R33 of Rps17. (B) The ribosome binding of Asc1/RACK1 mutant proteins defective in translation repression by polybasic amino-acid sequence. The *asc1*Δ cells harboring the *GFP-R12-FLAG-HIS3* reporter proteins were transformed with the various FLAG-Asc1/RACK1 plasmids. The levels of the *GFP-R12-FLAG-HIS3* reporter proteins were determined by Western blot analysis with anti-GFP and anti-FLAG antibodies. (C) Ribosome binding of Asc1/RACK1 mutant proteins. Cell extracts were prepared from the *asc1*Δ cells expressing various FLAG-Asc1/RACK1 mutant proteins. Extracts were subjected to polysome analysis, followed by Western blot analysis with anti-FLAG antibody. (D) Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for multiple endonucleolytic cleavages of *GFP-Rz* mRNA in a *dom34*Δ mutant background. *ski2*Δ*dom34*Δ*asc1*Δ mutant cells harboring p416*GAL1p*-*GFP-Rz-FLAG-HIS3* were transformed with the indicated plasmids expressing Asc1/RACK1 mutants. RNA samples were analyzed by 6% TBE-Urea PAGE and Northern blotting using DIG-labeled G3 probes.

mutants (Fig. 4D). These indicate that the Asc1/RACK1-bound ribosomes are competent to induce the sequential endonucleolytic cleavages induced by stalled ribosomes at the 3' end of mRNA.

Overproduction of truncated *GFP-Rz* mRNAs inhibits cell growth of the *ski2*Δ*dom34*Δ*asc1*Δ mutant. Dom34-Hbs1 promotes dissociation of the translation elongation complex into subunits, and we detected peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* mRNA in cell extracts of the *ski2*Δ*dom34*Δ mutant¹⁰. Although *GFP-Rz* mRNAs were mainly distributed in heavy polysome fractions, the peptidyl-tRNA is only present in monosome or light polysome fractions¹⁰. Because the sequential endonucleolytic cleavages were almost abolished in the absence of *ASC1/RACK1*, we had expected to detect the peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* mRNA in heavy polysome fractions derived from cell extracts of the *ski2*Δ*dom34*Δ*asc1*Δ mutant. However, in the *ski2*Δ*dom34*Δ*asc1*Δ mutant, the peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* mRNA was distributed in the monosome and light polysome fractions, and the distribution of peptidyl-tRNA was almost the same as that in *ski2*Δ*dom34*Δ mutant cells (Fig. 5A). The levels of peptidyl-tRNA in polysome fractions and the polypeptide in ribosome-free fractions were significantly increased by *ASC1/RACK1* deletion in the *ski2*Δ*dom34*Δ mutant background (Fig. 5A). Therefore, we quantified the levels of peptidyl-tRNA and free polypeptide derived from *GFP-Rz* mRNA in cell lysates (Fig. 5B). Neutral-PAGE (NuPAGE) followed by Western blot analysis revealed that the levels of peptidyl-tRNA and free polypeptide derived from *GFP-Rz* mRNA were drastically increased by *ASC1/RACK1* deletion in the *ski2*Δ*dom34*Δ mutant background. The level of peptidyl-tRNA in *ski2*Δ*dom34*Δ*asc1*Δ mutant was 9-fold higher

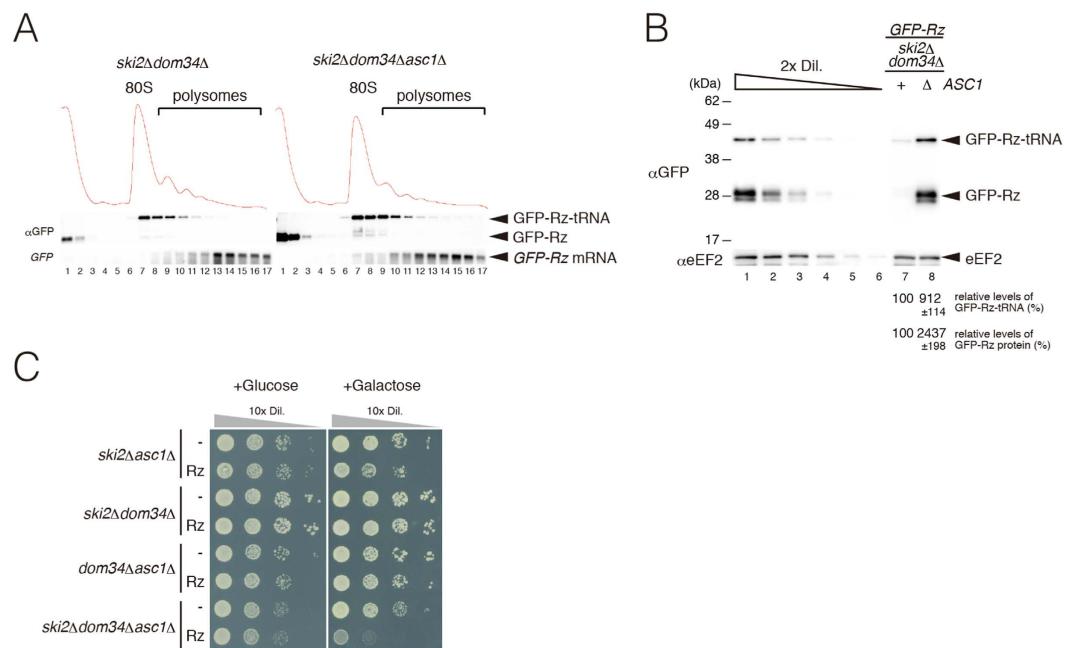


Figure 5. Asc1/RACK1 inhibits protein production from nonstop mRNA in the absence of Dom34. (A) Cell extracts were prepared from the indicated cells harboring p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3 plasmid, and polysome analysis was performed. (Top) Absorbance at 254 nm. (Middle) Neutral-PAGE followed by Western blotting with anti-GFP antibodies. (Bottom) Northern blotting using DIG-labeled G3 probes. (B) Levels of peptidyl-tRNA derived from GFP-Rz mRNA in *ski2Δdom34Δ* or *ski2Δdom34Δasc1Δ* mutant cells. Cell extracts were analyzed by Neutral-PAGE, followed by Western blotting using anti-GFP and anti-eEF2 antibodies. The levels of GFP-Rz and peptidyl-tRNA were determined using the samples from *ski2Δdom34Δasc1Δ* cells harboring p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3 as a standard curve (lanes 1–6). The relative levels of each GFP-Rz and peptidyl-tRNAs were normalized with respect to the levels of GFP-Rz and peptidyl-tRNAs in wild-type cells, which was assigned as a value of 100, and reported as the mean values from three independent experiments. (C) Overproduction of aberrant mRNAs lacking a termination codon inhibits growth of the *ski2Δdom34Δasc1Δ* mutant. Cells harboring pGAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 were grown in SC-Ura media containing 2% raffinose to log-phase, and the cells in a series of dilutions were grown on SC-Ura plates containing 2% glucose or 2% galactose.

than that in *ski2Δdom34Δ* mutant cells, and the level of free polypeptide GFP-Rz in the *ski2Δdom34Δasc1Δ* mutant was 24-fold higher than that in *ski2Δdom34Δ* mutant cells (Fig. 5B). These findings indicate that nonstop protein may be synthesized from GFP-Rz mRNA even in the absence of the Dom34-Hbs1 complex. Therefore, we propose that ribosomes stalled at the 3' end of mRNA in the absence of Dom34-Hbs1 may be dissociated into subunits in the *asc1Δ* mutant background. To determine the biological significance of this novel quality control system, we examined the effects of overproduction of aberrant mRNAs without termination codons in both *ski2Δdom34Δasc1Δ* mutant and *ski2Δdom34Δ* mutant. To overproduce GFP-Rz mRNA, cells harboring pGAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 plasmid were grown on SC-Ura plates containing galactose. Overproduction of GFP-Rz nonstop mRNA inhibited growth of the *ski2Δdom34Δasc1Δ* mutant, but not the *ski2Δdom34Δ* mutant (Fig. 5C). We propose that when the quality control system by Dom34-Hbs1 is impaired, Asc1/RACK1 plays a crucial role in the repression of aberrant products derived from mRNAs lacking termination codons by inducing sequential endonucleolytic cleavages.

Arrest products from truncated GFP-Rz mRNA were subjected to Ltn1-dependent degradation in *asc1* and *dom34* mutant cells. Co-translational degradation of polypeptide nascent chains plays a critical role in quality control of protein synthesis and the rescue of stalled ribosomes. Nonstop proteins are recognized by the ribosome-associated quality control (RQC) machinery, and targeted for proteasomal degradation^{27–32}. Dom34-Hbs1 and its mammalian homolog Pelota-hHbs1 is involved in RQC by facilitating the dissociation of stalled ribosomes at the 3' end of mRNA³². We previously reported that the level of the protein products derived from the reporter gene containing poly-lysine sequences within the ORF was drastically increased in *asc1Δ* mutant, whereas the levels of arrest products were significantly decreased in *asc1Δ* mutant even in the presence of the proteasome inhibitor⁹. Therefore, we determined the levels of GFP-Rz and the peptidyl-tRNA in *dom34Δ* and *dom34Δasc1Δ* mutant cells. Ltn1 significantly decreased the levels of Nonstop products in *dom34Δ* mutant cells (Fig. 6A, lanes 1 and 3) and *dom34Δasc1Δ* mutant cells (Fig. 6A, lanes 2 and 4). The ATPase activity of the Ski2-3-8 complex was abolished by E445Q mutation in the Ski2 DEXH core³³. The level of GFP-Rz mRNA was increased in the presence of Ski2-E445Q mutant protein in wild type cells (Fig. 6B). Because of the problems during the construction of *ski2Δasc1Δltn1Δdom34Δ* tetra mutants, we introduced the dominant negative Ski2-E445Q mutant to inhibit the exosome activity³³. In the presence of Ski2-E445Q mutant protein, Ltn1 also

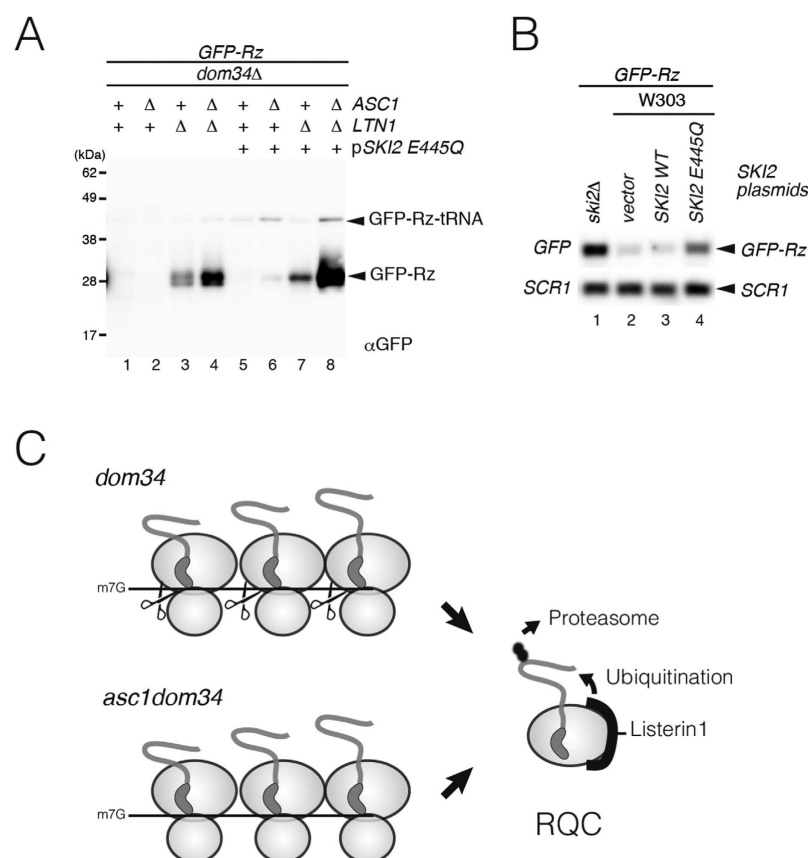


Figure 6. Nonstop products derived from truncated GFP-Rz mRNA were degraded by RQC in *dom34* and *dom34asc1* mutant cells. (A) Levels of peptidyl-tRNA and GFP-Rz protein derived from GFP-Rz mRNA were significantly increased by the deletion of Ltn1 in *dom34Δ* or *dom34Δasc1Δ* mutant cells. Cell extracts prepared from the indicated cells containing GFP-Rz-FLAG-HIS3 reporter were analyzed by Neutral-PAGE, followed by Western blotting using anti-GFP antibody. When indicated, cells were transformed with Ski2 E445Q plasmid (Lanes 5–8). (B) The level of truncated GFP-Rz mRNA was increased in wild type cells in the presence of dominant-negative Ski2-E445Q protein. (C) A model for quality control of ribosomes stalled at 3' ends of nonstop mRNAs in *dom34Δ* and *dom34Δasc1Δ* mutant. (Top) In the absence of Dom34, a stalled ribosome at the 3' end of a nonstop mRNA induces sequential cleavage, resulting in production of a ladder of small fragments protected by ribosomes. (Bottom) In the absence of Dom34 and Asc1/RACK1, a ribosome reaching the 3' end of a nonstop mRNA dissociates from mRNA as an 80S particle containing peptidyl-tRNA. In both mutant cells, Ltn1 degrades nonstop products derived from GFP-Rz mRNA.

decreased the levels of GFP-Rz and the peptidyl-tRNA in *dom34Δ* and *dom34Δasc1Δ* mutant cells (Fig. 6A, lanes 5–8). These indicate that Ltn1 degrades the arrest products from truncated GFP-Rz mRNA even in the absence of Asc1 and Dom34.

Discussion

The Dom34-Hbs1 complex dissociates ribosomes stalled at the 3' ends of 5'-NGD intermediates and non-stop mRNAs and stimulates their degradation by the exosome¹⁰. In *dom34Δ* mutant cells, such stalled ribosomes induce sequential endonucleolytic cleavages¹⁰. These cleavages have been proposed to play novel roles in NGD and NSD by reducing the levels of 5'-NGD intermediates or nonstop mRNA in the absence of Dom34-Hbs1-dependent mRNA decay mediated by the exosome¹⁰. The results in this study clearly showed that Asc1/RACK1 is required for sequential endonucleolytic cleavages induced by stalled ribosome at the 3' end of truncated GFP-Rz mRNA. Asc1/RACK1 also was reported to facilitate the endonucleolytic cleavages induced by translation arrests by polybasic sequences⁹. Therefore we propose that Asc1/RACK1 is a quality control factor to stimulate the endonucleolytic cleavages by stalled ribosome generally.

The level of GFP-Rz mRNA in *ski2Δdom34Δasc1Δ* mutant was 2.5-fold higher than that in *ski2Δdom34Δ* mutant cells (Fig. 2B). The levels of peptidyl-tRNA and GFP-Rz derived from truncated GFP-Rz mRNA were increased more than 9-fold and 24-fold respectively, by ASC1/RACK1 deletion in the *ski2Δdom34Δ* mutant background (Fig. 5B). Therefore, translation efficiency based on the ratio between protein products and mRNA levels was significantly increased by ASC1/RACK1 deletion in the *ski2Δdom34Δ* mutant background. Moreover, Asc1/RACK1 moderately but significantly stabilized GFP-Rz mRNA in *xrn1Δdom34Δ* mutant background (Fig. 1B, $t_{1/2} = 27.6$ min. for *xrn1Δdom34Δ* vs. $t_{1/2} = 18.2$ min. for *asc1Δxrn1Δdom34Δ*), suggesting that Asc1/RACK1

facilitates the exosome-dependent decay from 3' end of *GFP-Rz* mRNA. We suspect that ribosomes reaching the 3' end of a nonstop mRNA rapidly dissociate as 80S particles containing peptidyl-tRNA in the absence of Dom34 and Asc1/RACK1, resulting in elevated levels of peptidyl-tRNA derived from nonstop mRNA. We previously reported that Asc1/RACK1 is required for translation arrest induced by polybasic amino-acid sequence or tandem rare codons^{9,34}. Taken together, these observations suggest that Asc1/RACK1 plays general roles in translation regulation and mRNA quality control systems, and that Asc1/RACK1-bound ribosomes have the potential to stall in response to specific nascent peptide sequences, low levels of aminoacyl-tRNA, or a lack of a codon at the A-site.

Recent study showed that Asc1 promotes translation of mRNAs with short open reading frames³⁵. The D109Y mutant showed translational defects that, although correlated with those observed in the *asc1Δ* mutants were much smaller in magnitude. The R38DK40E mutant showed almost negligible effects on translation³⁵. In contrast, the defects of Asc1 mutants (38RDK40AAA, 85WDK87AAA, D109Y) in translation arrest by polybasic sequence and the endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome were almost the same as that of the *asc1Δ* mutant, although 16HNG18AAA mutant showed moderate effects (Fig. 4). We propose that robust and proper interaction between Asc1/RACK1 with 40S subunit may be crucial for co-translational quality controls to induce translation elongation or mRNA cleavage, but dispensable to promote translation of mRNAs with short open reading frames. *Drosophila* RACK1 is required in the 40S ribosomal subunit for IRES-dependent translation of Cricket Paralysis Virus and the picorna-like *Drosophila* C Virus³⁶. D108Y and R38D/K40E mutants were defective in these virus RNAs³⁶, suggesting the regulatory roles of the interaction of Asc1/RACK1 with 40S subunit. The identification of the interacting partner for Asc1/RACK1 is crucial to elucidate mechanisms of RACK1-dependent regulation of translation or mRNA decay.

The results in this study clearly showed that Ltn1 destabilizes aberrant nonstop polypeptides even in the absence of the ribosome dissociation factor Dom34:Hbs1 as previously reported³⁴. We also found that Ltn1 destabilizes nonstop products derived from *GFP-Rz* mRNA in the absence of ASC1/RACK1. These indicate that ASC1/RACK1 is dispensable for RQC for nonstop products. Previous results showed that Ltn1 destabilizes arrest products derived from *GFP-R12-FLAG-HIS3* reporter in a RACK1-dependent manner³⁴, indicating that the roles of Asc1/RACK1 in RQC differs depending on where ribosomes stalled. Mechanisms of the dissociation of stalled ribosomes are still largely unknown, and future study will identify putative factors that recognize stalled ribosome and induce the subunit dissociation independent of Dom34-Hbs1.

Methods

Strains and other methods. The strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary Table 1. Northern blot analysis, protein preparation, Western blot analysis were performed as previously described^{10,27}.

Yeast extract and sucrose gradient separation. Yeast cells were grown exponentially at 30 °C and harvested by centrifugation. Cell extracts were prepared as described previously²⁰. The equivalent of 50 A260 units were layered onto linear 10–50% sucrose density gradients. Sucrose gradients (10–50% sucrose in 10 mM Tris-acetate pH 7.4, 70 mM ammonium acetate, and 4 mM magnesium acetate) were prepared in polyallomer tubes (Beckman Coulter) using a Gradient Master. Crude extracts were layered on top of the sucrose gradients and centrifuged at 150,000 × *g* in a P28S rotor (Hitachi Koki, Japan) for 3 hours at 4 °C. Gradients were then fractionated (TOWA lab, Tsukuba). Polysome profiles were generated by continuous absorbance measurement at 254 nm using a single path UV-1 optical unit (ATTO BioMini UV-monitor) connected to a chart recorder (ATTO digital mini-recorder). Equal volume fractions were collected and processed for Northern or Western blotting as described above³⁷.

Determination of mRNA stability. Yeast cells were grown in minimal medium (SC medium) containing 2% galactose. Cells were grown to OD₆₀₀ = 0.6, harvested and resuspended in medium containing 2% glucose to inhibit transcription from the *GAL1* promoter. At the indicated times, the cells were harvested to prepare RNA samples by acidic phenol RNA extraction method using water-saturated phenol and phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) mixture. mRNA levels of reporter genes were determined by Northern blotting using digoxigenin (DIG)-labeled *GFP* probes prepared by PCR-based nucleic acid labeling using PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche, NJ, USA) according to the procedure specified by the manufacturer and primers 5'-GCTCTAGAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTTCAC-3' and 5'-GGACTAGTTTTGTATAGTTCATCCATGCCA-3'. *GFP G3* probe is a 5' end DIG-labeled oligonucleotide 5'-TTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCAGTTACAAACTCAAGAAGGACC-3'. The intensity of bands on the blots was quantified on a LAS4000 mini (GE Healthcare). Relative RNA levels were determined using Multi Gauge v3.0 (Fujifilm, Japan) by comparison to a standard curve using a series of dilutions of samples from time 0 (just before the addition of glucose).

Split-tag affinity purification of stalled ribosomes. Stalled ribosomes were purified from cells expressing both ProtA-TEV-GFP-Rz-His3 containing and Rps2-FLAG proteins by split-tag affinity purification. Yeast cells were transformed with plasmids harbouring *ProteinA-TEV-GFP-Rz-HIS3* gene were cultured in 1 L of synthetic complete medium. The ProteinA-TEV-GFP-Rz was affinity-purified from whole cell lysates using IgG SepharoseTM (GE Healthcare), followed by the treatment with TEV protease. Ribosome complex containing ProteinA-TEV-GFP-Rz was purified with Anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako, Japan) and eluted by 250 ng/μL of FLAG peptides.

Detection of peptidyl-tRNA. Cell extracts or polysome fractions were analyzed by NuPAGE (Invitrogen, USA) followed by Western blotting with anti-GFP antibodies¹⁰. To destroy the RNA moiety of peptidyl-tRNA, RNase A was added to the samples at a final concentration of 10 mg/l and the samples were incubated at 37 °C for 10 min. (data not shown).

Spot assay. Cells harboring p416GAL1p-GFP-Rz-FLAG-HIS3 plasmids were grown with SC-Ura media containing 2% raffinose to OD₆₀₀ = 0.3. The cells were spotted on SC-Ura plate containing 2% glucose or 2% galactose after a series of 10-fold dilution, and incubated at 30 °C for 2 days (glucose) or 3 days (galactose).

Overexpression of dominant-negative Ski2 and inhibition of exosome. The ATPase activity of the Ski2-3-8 complex was abolished by E445Q mutation in the Ski2 DEXH core³³. To inhibit exosome activity, p415GPDp-SKI2 E445Q plasmids were introduced to cells. Inhibition of exosome was confirmed by northern blot to detect GFP-Rz mRNA.

References

- Schoenberg, D. R. & Maquat, L. E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* **13**, 246–259, doi: 10.1038/nrg3160 (2012).
- Pechmann, S., Willmund, F. & Frydman, J. The ribosome as a hub for protein quality control. *Mol Cell* **49**, 411–421, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.020 (2013).
- Shao, S. & Hegde, R. S. Target Selection during Protein Quality Control. *Trends Biochem Sci* **41**, 124–137, doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.007 (2016).
- Brandman, O. & Hegde, R. S. Ribosome-associated protein quality control. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 7–15, doi: 10.1038/nsmb.3147 (2016).
- Lykke-Andersen, J. & Bennett, E. J. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *J Cell Biol* **204**, 467–476, doi: 10.1083/jcb.201311103 (2014).
- Doma, M. K. & Parker, R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564, doi: 10.1038/nature04530 (2006).
- Passos, D. O. *et al.* Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Mol Biol Cell* **20**, 3025–3032, doi: 10.1091/mbc.E09-01-0028 (2009).
- Harigaya, Y. & Parker, R. No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 132–141, doi: 10.1002/wrna.17 (2010).
- Kuroha, K. *et al.* Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* **11**, 956–961, doi: 10.1038/embor.2010.169 (2010).
- Tsuboi, T. *et al.* Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell* **46**, 518–529, doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013 (2012).
- van den Elzen, A. M. *et al.* Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1446–1452, doi: 10.1038/nsmb.1963 (2010).
- Shoemaker, C. J., Eyler, D. E. & Green, R. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* **330**, 369–372, doi: 10.1126/science.1192430 (2010).
- Shoemaker, C. J. & Green, R. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, E1392–1398, doi: 10.1073/pnas.1113956108 (2011).
- Pisareva, V. P., Skabkin, M. A., Hellen, C. U., Pestova, T. V. & Pisarev, A. V. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J* **30**, 1804–1817, doi: 10.1038/emboj.2011.93 (2011).
- Saito, S., Hosoda, N. & Hoshino, S. I. Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.M112.448977 (2013).
- Guo, J. *et al.* Dissection of the relationship between RACK1 and heterotrimeric G-proteins in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**, 1681–1694, doi: 10.1093/pcp/pcp113 (2009).
- Volta, V. *et al.* RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1439–1450, doi: 10.1007/s00018-012-1215-y (2013).
- Yaka, R. *et al.* NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 5710–5715, doi: 10.1073/pnas.062046299 (2002).
- Kadmas, J. L., Smith, M. A., Pronovost, S. M. & Beckerle, M. C. Characterization of RACK1 function in Drosophila development. *Dev Dyn* **236**, 2207–2215, doi: 10.1002/dvdy.21217 (2007).
- Inada, T. *et al.* One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA* **8**, 948–958 (2002).
- Coyle, S. M., Gilbert, W. V. & Doudna, J. A. Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome *in vivo*. *Mol Cell Biol* **29**, 1626–1634, doi: 10.1128/MCB.01718-08 (2009).
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A. & Ban, N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* **331**, 730–736, doi: 10.1126/science.1198308 (2011).
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J. & Nissen, P. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* **5**, 1137–1141, doi: 10.1038/sj.embor.7400291 (2004).
- Sengupta, J. *et al.* Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 957–962, doi: 10.1038/nsmb822 (2004).
- Wolf, A. S. & Grayhack, E. J. Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA* **21**, 935–945, doi: 10.1261/rna.049080.114 (2015).
- Taylor, D. J. *et al.* Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. *Structure* **17**, 1591–1604, doi: 10.1016/j.str.2009.09.015 (2009).
- Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev* **21**, 519–524, doi: 10.1101/gad.1490207 (2007).
- Dimitrova, L. N., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **284**, 10343–10352, doi: 10.1074/jbc.M808840200 (2009).
- Brandman, O. *et al.* A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042–1054, doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044 (2012).
- Shen, P. S. *et al.* Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* **347**, 75–78, doi: 10.1126/science.1259724 (2015).
- Shao, S., Brown, A., Santhanam, B. & Hegde, R. S. Structure and assembly pathway of the ribosome quality control complex. *Mol Cell* **57**, 433–444, doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.015 (2015).
- Shao, S. & Hegde, R. S. Reconstitution of a minimal ribosome-associated ubiquitination pathway with purified factors. *Mol Cell* **55**, 880–890, doi: 10.1016/j.molcel.2014.07.006 (2014).
- Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M. & Conti, E. The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* **154**, 814–826, doi: 10.1016/j.cell.2013.07.017 (2013).
- Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S. & Inada, T. Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells* **19**, 1–12, doi: 10.1111/gtc.12106 (2014).

35. Thompson, M. K., Rojas-Duran, M. F., Gangaramani, P. & Gilbert, W. V. The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *Elife* **5**, doi: 10.7554/eLife.11154 (2016).
36. Majzoub, K. *et al.* RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* **159**, 1086–1095, doi: 10.1016/j.cell.2014.10.041 (2014).
37. Inada, T. & Aiba, H. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J* **24**, 1584–1595, doi: 10.1038/sj.emboj.7600636 (2005).

Acknowledgements

We thank members of our laboratories for discussion and critical comments on the manuscript. K.I. was a recipient of a JSPS Research Fellowship. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science (grant numbers 22370062 and 26116003), and by Research Grants in the Natural Sciences from the Takeda Foundation (to TI).

Author Contributions

K.I. performed experiments and data analysis. T.I. designed the study, performed data analysis. K.I. and T.I. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Ikeuchi, K. and Inada, T. Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci. Rep.* **6**, 28234; doi: 10.1038/srep28234 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast

Ryo Matsuda[†], Ken Ikeuchi[†], Sene Nomura[†] and Toshifumi Inada^{*}

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan

Quality control systems eliminate aberrant proteins derived from aberrant mRNAs. Two E3 ubiquitin ligases, Ltn1 and Not4, are involved in proteasomal protein degradation coupled to translation arrest. Here, we evaluated nonstop and translation arrest products degraded in a poly(A) tail-independent manner. Ltn1 was found to degrade aberrant nonstop polypeptides derived from nonstop mRNA lacking a termination codon, but not peptidyl-tRNA, even in the absence of the ribosome dissociation complex Dom34:Hbs1. The receptor for activated C kinase (RACK1/ASC1) was identified as a factor required for nascent peptide-dependent translation arrest as well as Ltn1-dependent protein degradation. Both Not4 and Ltn1 were involved in the degradation of various arrest products in a poly(A) tail-independent manner. Furthermore, carboxyl terminus-truncated degradation intermediates of arrest products were stabilized in a *cdc48-3* mutant defective in unfolding or the disassembly related to proteasomal degradation. Thus, we propose that stalled ribosomes may be dissociated into subunits and that peptidyl-tRNA on the 60S subunit is ubiquitinated by Ltn1 and Cdc48 is required for the degradation following release from tRNA.

Introduction

mRNA surveillance systems recognize aberrant translation elongation and termination and induce rapid mRNA decay. In particular, recent studies have shown that aberrant proteins derived from aberrant mRNAs are recognized and rapidly degraded by specific quality control systems and that this process is crucial for repressing the expression of aberrant products. Aberrant mRNA lacking a termination codon (nonstop mRNA) is produced mainly by polyadenylation within an open reading frames (ORF) and is rapidly degraded by the quality control system designated nonstop decay (NSD) (Frischmeyer *et al.* 2002; van Hoof & Parker 2002). In addition to the rapid decay of nonstop mRNA by exosomes, rapid degradation of nonstop proteins is another crucial mechanism for preventing aberrant protein expression (Inada & Aiba 2005; Ito-Harashima *et al.* 2007; Wilson *et al.* 2007; Bengtson & Joazeiro 2010).

The stalling of ribosomes during translational elongation due to the formation of stable RNA secondary structures, depurination of mRNA, rare codons or premature stop codons leads to endonucleolytic cleavage of the mRNA in the vicinity of the stalled site, a process that is referred to as no-go decay (Doma & Parker 2006; Gandhi *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010; van den Elzen *et al.* 2010; Kobayashi *et al.* 2010; Izawa *et al.* 2012; Tsuboi *et al.* 2012). Translation arrest induced by a nascent peptide with positively charged residues results in co-translational degradation of the arrested protein product by the proteasome (Dimitrova *et al.* 2009). Two ubiquitin ligases, Not4 and Ltn1, are involved in the degradation of the arrest product resulting from a poly-lysine sequence (Wilson *et al.* 2007; Dimitrova *et al.* 2009; Bengtson & Joazeiro 2010; Brandman *et al.* 2012; Defenouillere *et al.* 2013). Not4 is a component of the Ccr4-Not deadenylase, but is not essential for the activity and assembly of that complex (Bai *et al.* 1999). Not4 acts as an E3 ubiquitin ligase for the nascent peptide-associated complex (NAC) (Panassenko *et al.* 2006; Mulder *et al.* 2007). In addition, Not4 associates with polyribosomes, as revealed by polysome fractionation (Dimitrova *et al.* 2009; Panassenko

Communicated by: Haruhiko Siomi

^{*}Correspondence: tinada@m.tohoku.ac.jp

[†]These authors contributed equally to this work.

DOI: 10.1111/gtc.12106

© 2013 The Authors

Genes to Cells © 2013 by the Molecular Biology Society of Japan and Wiley Publishing Asia Pty Ltd

& Collart 2012), and is involved in protein degradation of the translation arrest products produced by poly-lysine sequences, but not those of nonstop proteins (Dimitrova *et al.* 2009). Ltn1 is also involved in the co-translational protein degradation of arrest products produced by the translation of poly(A) sequences (Wilson *et al.* 2007; Bengtson & Joazeiro 2010). The mechanisms by which ubiquitin ligases recognize aberrant products produced from aberrant mRNAs have been investigated. For example, Ltn1 was shown to be involved in co-translational protein degradation of arrest products produced by the translation of poly(A) sequences, suggesting that Ltn1 may recognize the specific conformation used by a stalled ribosome when translating a poly(A) sequence (Bengtson & Joazeiro 2010). *ASC1* encodes an orthologue of a receptor for activated C kinase (*RACK1*) in *Saccharomyces cerevisiae*, and it was also identified as a factor required for nascent peptide-dependent translation arrest. *RACK1/ASC1*-dependent translation arrest was shown to lead to co-translational degradation of the arrest product by the proteasome (Kuroha *et al.* 2010). These findings suggest that *RACK1/ASC1* may be crucial for the recognition of aberrant polypeptides by Ltn1; however, the role of *RACK1/ASC1* in Ltn1-dependent rapid degradation of aberrant products by the proteasome has not been investigated.

Ltn1 is specifically associated with the 60S ribosomal subunit, suggesting that ubiquitination of aberrant proteins may take place on 60S subunits containing peptidyl-tRNA *in vivo* (Bengtson & Joazeiro 2010; Brandman *et al.* 2012) and *in vitro* (Shao *et al.* 2013). The Dom34:Hbs1 complex stimulates the endonucleolytic cleavage of mRNA induced by translation arrest *in vivo* (Doma & Parker 2006; Chen *et al.* 2010; van den Elzen *et al.* 2010; Kobayashi *et al.* 2010) and dissociates the subunits of stalled ribosomes *in vitro* (Shoemaker *et al.* 2010; Pisareva *et al.* 2011; Shoemaker & Green 2011). In addition, Dom34:Hbs1 dissociates stalled ribosomes at the 3' end of nonstop mRNA and stimulates its degradation by exosomes *in vivo* (Kobayashi *et al.* 2010; Izawa *et al.* 2012). However, the relationship between Dom34:Hbs1-dependent subunit dissociation of stalled ribosomes and Ltn1-dependent rapid degradation of nonstop protein products remains to be resolved.

Recent studies have identified novel factors, including Rqc1 and Tae2, involved in co-translational degradation of arrest products produced by polybasic amino-acid-sequence-inducing translation arrest

(Brandman *et al.* 2012; Defenouillere *et al.* 2013). Rqc1, Tae2 and Ltn1 are members of the 60S subunit-bound complex, and 60S binding of Rqc1 is independent of Ltn1 and Tae2, whereas 60S binding of Tae2 is independent of Rqc1. Furthermore, affinity-purified Rqc1 or Tae2 proteins have been associated with the 60S subunit and ubiquitinated products, indicating that these factors stimulate but are not essential for the ubiquitination of arrest products on the 60S subunit. Rqc1 levels are auto-regulated by a negative feedback loop that depends on the basic amino acid sequence at the N-terminal region of Rqc1. In addition, Cdc48 and its cofactors, Ufd1 and Npl4, are also associated with the 60S subunit complex, and the binding of the Cdc48-Ufd1-Npl4 complex largely depends on Ltn1 and Tae2, which suggests that ubiquitinated arrest products on the 60S subunit may recruit the Cdc48 complex. Recent studies have also clearly showed that Cdc48/p97 promotes the degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome (Brandman *et al.* 2012; Defenouillere *et al.* 2013; Verma *et al.* 2013).

In this study, we examined the mechanism of co-translational degradation of aberrant proteins by the proteasome, as well as the roles of two E3 ubiquitin ligases and the stalled ribosome dissociation factor Dom34:Hbs1. We found that aberrant nonstop polypeptides derived from nonstop mRNA lacking a poly(A) tail were dramatically stabilized following *LTN1* deletion in the absence of the ribosome dissociation factor Dom34:Hbs1. Furthermore, both Not4 and Ltn1 were involved in the degradation of various arrest products associated with *RACK1/ASC1*-dependent translation arrest. Degradation intermediates of arrest products were stabilized in a *cdc48-3* temperature-sensitive mutant, and the degradation intermediate was found to lack a carboxyl-terminal region. These findings suggest that aberrant proteins may be degraded from the carboxyl terminus and that unfolding of target proteins by Cdc48 is required for proteasomal degradation. Based on these results, we propose models for the protein degradation pathways associated with no-go and nonstop mRNA surveillance systems.

Results

Ltn1 degrades products of mRNAs lacking a termination codon regardless of a poly(A) tail

To determine the substrate specificity of Ltn1, the degradation of an aberrant protein derived from a

stop codon-less mRNA that lacks a poly(A) tail was examined in the *ltn1* mutant. The Dom34:Hbs1 complex was required for protein synthesis from the stop codon-less *GFP-Rz* mRNA that was produced from the *GFP-Rz-FLAG-HIS3* (*Rz*) reporter gene via the self-cleavage of a hammerhead ribozyme sequence inserted within the ORF (Fig. 1A) (Kobayashi *et al.* 2010; Izawa *et al.* 2012; Tsuboi *et al.* 2012). The amount of protein derived from *GFP-Rz* mRNA was significantly increased in *ltn1*Δ mutant cells, but not *not4*Δ mutant cells (Fig. 1B, lanes 9–12). As expected, the level of protein derived from *GFP-FLAG-HIS3-NS* (*NS*) mRNA, which contains a poly(A) tail, was also significantly increased in *ltn1*Δ mutant cells, but not in *not4*Δ mutant cells (Fig. 1B, lanes 5–8). These findings indicate that Ltn1 primarily degrades protein products derived from aberrant mRNAs that lack a termination codon. Furthermore, a deletion or point mutation in the RING domain of Ltn1, which decreases the binding affinity of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme, was defective in down-regulating both nonstop proteins (Fig. 1C, lanes 5–12). We confirmed that the expression level of each protein was almost the same as that of wild type (Fig. S1 in Supporting Information), indicating that the absence of complementation in the mutants is due to loss of protein interaction and not of absence of truncated or mutated forms of these proteins. These data indicate that the E3 ubiquitin ligase activity of Ltn1 is required for the degradation of nonstop proteins and that translation of a poly(A) tail in nonstop mRNA is not essential for efficient Ltn1-dependent proteasomal degradation.

It has previously been proposed that nonstop products may be co-translationally degraded by the proteasome (Ito-Harashima *et al.* 2007; Dimitrova *et al.* 2009; Bengtson & Joazeiro 2010). To determine whether peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* mRNA is increased in *ltn1*Δ mutant cells, NuPAGE followed by Western blotting with an anti-GFP antibody was carried out. The level of translated *GFP-Rz* was increased in *ltn1*Δ or *ltn1*Δ*not4*Δ mutant cells, but peptidyl-tRNA was barely detectable, even in the mutants (Fig. 1D), suggesting that peptidyl-tRNA on stalled 80S ribosomes might not be a substrate for the ligase, as previously proposed (Bengtson & Joazeiro 2010; Brandman *et al.* 2012). Dom34:Hbs1 is known to be required for the dissociation of ribosomes that are stalled at the 3' end of *GFP-Rz* mRNA and for peptide release from tRNA *in vivo* (Tsuboi *et al.* 2012). To examine whether peptidyl-tRNA was stabilized in *ltn1*Δ*dom34*Δ mutant cells,

polysome analysis followed by NuPAGE and Western blotting with an anti-GFP antibody was carried out. In *ltn1*Δ mutant cells, the amount of free peptide in the ribosome-free fractions was increased, but peptidyl-tRNA was barely detectable (Fig. 1E, WT and *ltn1*Δ panels). The peptidyl-tRNA detected in *dom34*Δ mutant cells was scarcely increased in *ltn1*Δ*dom34*Δ mutant cells, although the level of free peptide was drastically increased (Fig. 1E, *dom34*Δ and *ltn1*Δ*dom34*Δ panels). The level of free peptide in *dom34*Δ mutant cells was also increased following treatment with the proteasome inhibitor MG132, but the level of peptidyl-tRNA was not (Fig. 1E, *dom34*Δ+MG132 panel). These findings indicate that aberrant nonstop polypeptides were drastically stabilized by *LTN1* deletion even in the absence of the ribosome dissociation factor Dom34.

Substrate specificity of Ltn1 in protein degradation coupled to translation arrest

Ltn1 destabilizes aberrant products derived from *GFP-Rz* mRNA lacking a poly(A) tail, indicating that translation arrest induced by the poly(A) sequence is not essential for Ltn1-dependent protein degradation. To address the substrate specificity of Ltn1 for co-translational degradation by the proteasome, the stabilization of the arrest products derived from various reporters shown in Fig. 2A was examined. The arrest products derived from *GFP-K12-FLAG-HIS3* (*K12*) or *GFP-rare-FLAG-HIS3* (*Rare*) mRNA were stabilized in *ltn1*Δ mutant cells (Fig. 2B, lanes 9–10, 13–14). In contrast, the levels of the full-length products of the *K12*, *Rare* and *C-K12* reporters were not increased in the *ltn1*Δ mutant (Fig. 2B, lanes 10, 12, 14, 16, 18). Furthermore, Ltn1 mutants with a deletion or a point mutation in the RING domain were defective in the down-regulation of both arrest proteins (Fig. 2C, lanes 11–12, 15–16). These results indicate that Ltn1 is involved in the proteasomal degradation of translation arrest products, and it is consistent with recent study (Letzring *et al.* 2013).

RACK1/ASC1 is required for translation arrest by polybasic amino acid sequences, and the arrest product derived from the *GFP-K12-FLAG-HIS3* reporter was not detected in *rack1/asc1*Δ mutant cells even in the presence of MG132 (Kuroha *et al.* 2010). Therefore, we examined translation arrest in various reporter genes and found that the levels of the full-length product of the *Rare* reporter, as well as the *K12* and *C-K12* reporter, were increased in *rack1/*

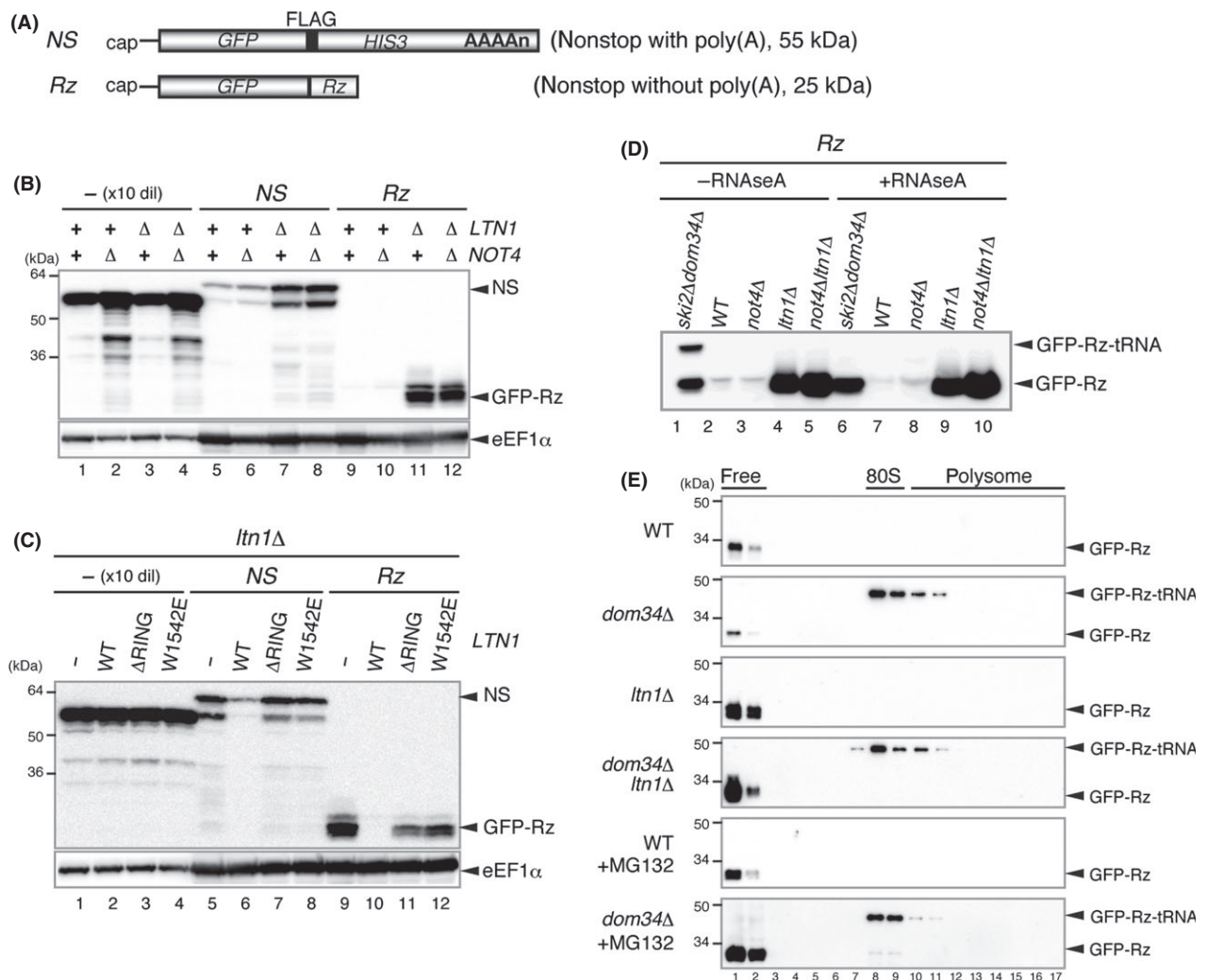


Figure 1 Ltn1 destabilizes nonstop protein products. (A) Schematic drawing of the reporter NS (*GFP-FLAG-HIS3-NS*) and Rz (*GFP-Rz-FLAG-HIS3*) mRNAs lacking a termination codon. The filled boxes indicate the open reading frames, the lines represent nontranslated regions, and the tract of As denotes the poly(A) tail. The dark box shows the FLAG tag sequence, and Rz indicates a hammerhead ribozyme sequence that induces self-cleavage. (B) The level of nonstop products was increased in *ltn1Δ*, but not *not4Δ*, mutant cells. Yeast strains containing the p416*GPDp-GFP-FLAG-HIS3* (–), p416 *GPDp-GFP-FLAG-HIS3-NS* (NS) or p416 *GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3* (Rz) reporter plasmids were analyzed by Western blotting with anti-GFP (Top panel) or anti-EF-1 α antibodies (Bottom panel). When indicated, the samples were diluted 10-fold. (C) Binding of Ltn1 to the E2 enzyme is required for the down-regulation of nonstop products. W303*ltn1Δ* mutant cells containing the *GFP-FLAG-HIS3-NS* (NS) or *GFP-Rz-FLAG-HIS3* (Rz) nonstop reporter genes were transformed with plasmids expressing wild-type Ltn1 or Ltn1 mutant proteins defective in binding to the E2 enzyme. The levels of arrest products were determined by Western blotting with anti-GFP (Top panel) or anti-EF-1 α antibodies (Bottom panel). When indicated, the samples were diluted 10-fold. (D) Peptidyl-tRNA derived from *GFP-Rz* mRNA was not increased in *ltn1Δ* mutant cells. Cell extracts were analyzed by NuPAGE followed by Western blotting. The indicated samples were treated with RNaseA before NuPAGE. (E) Aberrant polypeptides were dramatically stabilized by *LTN1* deletion in the absence of Dom34. Cell extracts were prepared from cells harboring the p416*GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3* plasmid, and polysome analysis followed by NuPAGE and Western blotting with an anti-GFP antibody was carried out. Cell extracts indicated by +MG132 were prepared 2 h following the addition of 0.2 mM MG132 and analyzed by Western blot analysis.

asc1Δ mutant cells (Fig. 2B, lanes 11–12, 15–16, 18–19), whereas the levels of the full-length products of *GFP-FLAG-HIS3* and *GFP-(GGN)₁₂-FLAG-HIS3*

reporter mRNAs were not (Fig. 2B, lanes 3–4, 7–8). These data indicate that RACK1/ASC1 is involved in translation arrest induced by poly-lysine sequences

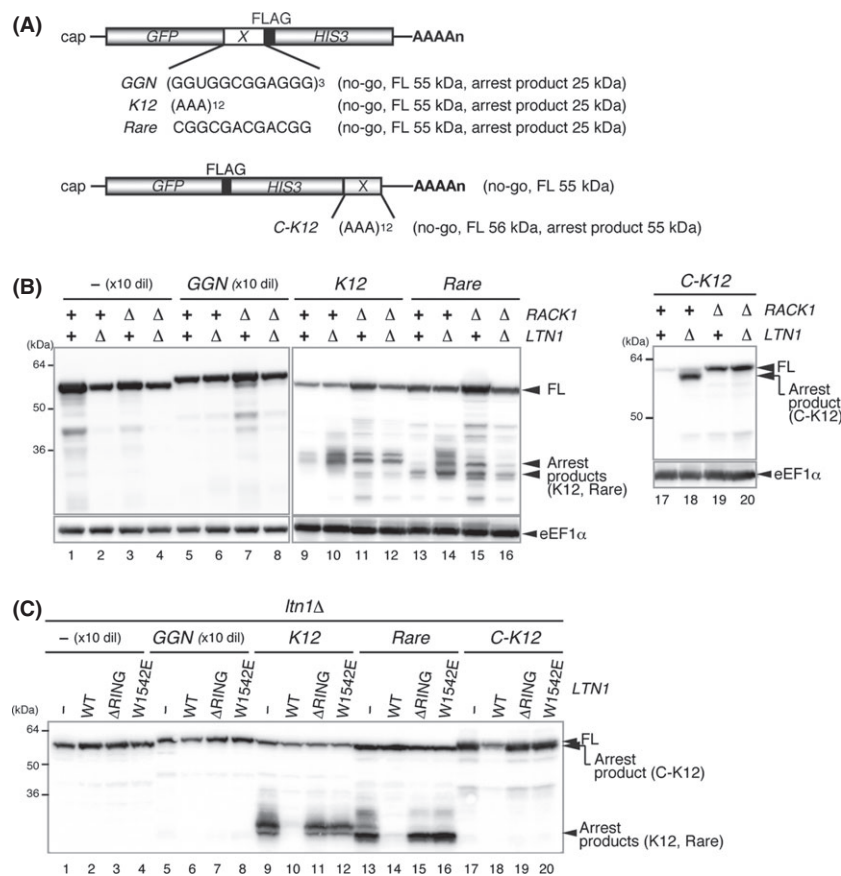


Figure 2 Ltn1 degrades aberrant proteins produced by various types of translation arrest. (A) Schematic drawing of the reporter *GGN* (*GFP-GGN-FLAG-HIS3*), *K12(AAA)* (*GFP-K12-FLAG-HIS3*) and *Rare* (*GFP-rare codons-FLAG-HIS3*) mRNAs. The filled boxes indicate the open reading frames, the lines represent nontranslated regions, and the tract of As denotes the poly (A) tail. The dark box shows the FLAG tag sequence, and X indicates the region of various translation arrest-inducing sequences. (B) Ltn1 destabilizes arrest products produced by RACK1/ASC1-dependent translation arrest. Indicated yeast cells containing the *GFP-FLAG-HIS3* (–), *GFP-(GGN)12-FLAG-HIS3* (*GGN*), *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3* (*K12*), *GFP-rare codons-FLAG-HIS3* (*Rare*) or *GFP-FLAG-HIS3-K12* (*C-K12*) reporter genes were grown in SC-Glu Ura medium, and protein samples were analyzed as in Fig. 1B. When indicated, protein samples were diluted 10-fold. (C) The binding of Ltn1 to E2 enzyme is required for the degradation of arrest products derived from reporter genes. The *ltn1Δ* mutant cells containing the *GFP-FLAG-HIS3* (–), *GFP-(GGN)12-FLAG-HIS3* (*GGN*), *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3* (*K12*), *GFP-rare codons-FLAG-HIS3* (*Rare*) or *GFP-FLAG-HIS3-K12* (*C-K12*) reporter genes were transformed with plasmids expressing Ltn1 or Ltn1 mutant proteins defective in binding to the E2 enzyme. The levels of arrest products were determined by Western blotting with an anti-GFP antibody. When indicated, protein samples were diluted 10-fold.

and tandem rare codons, but may not GGN repeats sequence. The level of the arrest products of the *K12* reporter or the *Rare* reporter construct was increased in the *ltn1Δ* mutant (Fig. 2B, lanes 9–10 and 13–14). However, the level of these arrest products in the *rack1/asc1Δ* mutant was not increased by the deletion of *LTN1* (Fig. 2B, lanes 12, 16). These results indicate that Ltn1 is involved in the degradation of arrest products in an RACK1/ASC1-dependent manner.

Synergistic action of two E3 ubiquitin ligases in the proteasomal degradation of arrest products

Two distinct E3 ubiquitin ligases, Not4 and Ltn1, are involved in the degradation of arrest products associated with translation arrest, although the relationship between these two ubiquitin ligases remains largely unknown. To determine the substrate specificity of Not4 and Ltn1, the levels of various translation arrest

products were measured in *not4Δ* and *not4Δltn1Δ* mutant cells. The levels of arrest products derived from *K12* or *Rare* reporter mRNA were stabilized in both *not4Δ* and *ltn1Δ* mutant cells and were dramatically increased in *not4Δltn1Δ* double mutant cells (Fig. 3A, lanes 9–16). In addition, the Not4 mutant with a point mutation in the RING domain was defective in the down-regulation of arrest products derived from *K12* (Fig. 3B). By contrast, the levels of proteins derived from *GFP-Rz-FLAG-HIS3* (*Rz*) or *GFP-FLAG-HIS3-NS* (*NS*) mRNA were significantly increased in *ltn1Δ* or *not4Δltn1Δ* double mutant cells, but not in *not4Δ* mutant cells (Fig. 1B, lanes 6–8 and 10–12). These data indicate that Not4 destabilizes the arrest products produced by translation arrest within mRNA, but not those that occur at the 3' end of mRNA, which is consistent with previous results (Dimitrova *et al.* 2009).

Not4 is involved in protein degradation of translation arrest products produced by poly-lysine sequences (Dimitrova *et al.* 2009), but not those of nonstop proteins (Dimitrova *et al.* 2009; Bengtson & Joazeiro 2010; Duttler *et al.* 2013). To address the role of the poly(A) tail in Not4-dependent degradation of arrest products, we examined the degradation of arrest products derived from *GFP-K12-FLAG-HIS3-Rz* reporter mRNAs lacking a poly(A) tail (Fig. 3C, -Rz constructs). The level of *GFP-K12-FLAG-HIS3-Rz* mRNA was lower than that of *GFP-K12-FLAG-HIS3* mRNA in wild-type or *not4Δltn1Δ* mutant cells (Fig. 3E, lanes 1–2 and 7–8), and there was no significant difference between the levels of these mRNAs in *not4Δ* or *ltn1Δ* single mutants (Fig. 3E, lanes 3–4 and 5–6). In contrast, the level of full-length product derived from *GFP-K12-FLAG-HIS3-Rz* was also significantly decreased (Fig. 3D, even lanes), and the levels of arrest products were significantly increased following *LTN1* deletion in the *NOT4* (Fig. 3D, lanes 1–2 and 5–6) or *not4Δ* mutant background (Fig. 3D, lanes 3–4 and 7–8). In addition, the levels of arrest products were slightly increased as a result of *NOT4* deletion in the *LTN1* (Fig. 3D, lanes 1–4) or *ltn1Δ* mutant background (Fig. 3D, lanes 5–8). But the levels of arrest products were not affected by artificial removal of the poly(A) tail in any cases; these data suggest that the poly(A) tail may not be required for the degradation of arrest products by Ltn1 and Not4.

Ubiquitin-dependent degradation may occur after peptide release from the tRNA

Cdc48 is a member of the hexameric AAA family of proteins that possess two ATPase domains, and this

protein converts energy from ATP hydrolysis to structurally remodel or unfold ubiquitinated proteins for efficient degradation by the proteasome (Bebeacua *et al.* 2012). Cdc48 is also involved in the ER-associated degradation (ERAD) pathway, which is the most thoroughly characterized protein quality control system (Meyer 2012). The current model for ERAD proposes that aberrant proteins are translocated to the cytosol from the ER, and then an Ufd1-Npl4-Cdc48 complex extracts the aberrant protein for degradation by the proteasome (Brandman *et al.* 2012; Defenouillere *et al.* 2013; Verma *et al.* 2013). Cdc48 associates with the 60S subunit as a complex with Ltn1 and other novel factors required for the degradation of arrest products produced by translation arrest mediated by poly-lysine sequences (Brandman *et al.* 2012; Defenouillere *et al.* 2013). To address the role of Cdc48 in the degradation of aberrant nonstop proteins and the degradation of arrest products, the expression of the *K12* and *Rare* reporter proteins was examined in *cdc48-3* mutant cells in which the degradation of ERAD substrates was defective at the permissive temperature. Western blotting with an anti-GFP antibody was used to detect putative degradation intermediates of translation arrest products derived from *GFP-FLAG-HIS3-C-K12* (*C-K12*) reporter mRNA (Fig. 4A, lane 18), but not of other reporter proteins in the *ltn1Δ* mutant (Fig. 4A, lanes 1–16). We found that *cdc48-3* mutant cells always express less reporter proteins than the wild-type cells, suggesting that this may be due to overall reduction in translation activity in the mutant. To confirm that degradation intermediates stabilized in *cdc48-3* mutant cells containing an intact GFP moiety, a 3xHA tag sequence was inserted at the amino terminus of the reporter genes (Fig. 4B). The stabilized products derived from *3HA-GFP-FLAG-HIS3-C-K12* (*HA-C-K12*) and *3HA-GFP-FLAG-HIS3-Rare* (*HA-C-Rare*) mRNA were detected using anti-HA antibodies (Fig. 4C, top panel), and these findings indicated that the stabilized products derived from the *C-K12* reporter mRNA contained intact GFP and part of the His3 protein. Although the level of intermediate product derived from the *C-K12* reporter mRNA was significantly reduced in the *ltn1Δcdc48-3* mutant, the level of the full-length *C-K12* product was increased (Fig. 4A, lanes 19–20), and the arrest products derived from *K12* or *Rare* reporter genes were also detected (Fig. 4A, lanes 11–12, 15–16). We also carried out Western blot with anti-FLAG antibodies to show the presence of the FLAG, which would indicate that the GFP is intact in these intermediate products (Fig. 4C,

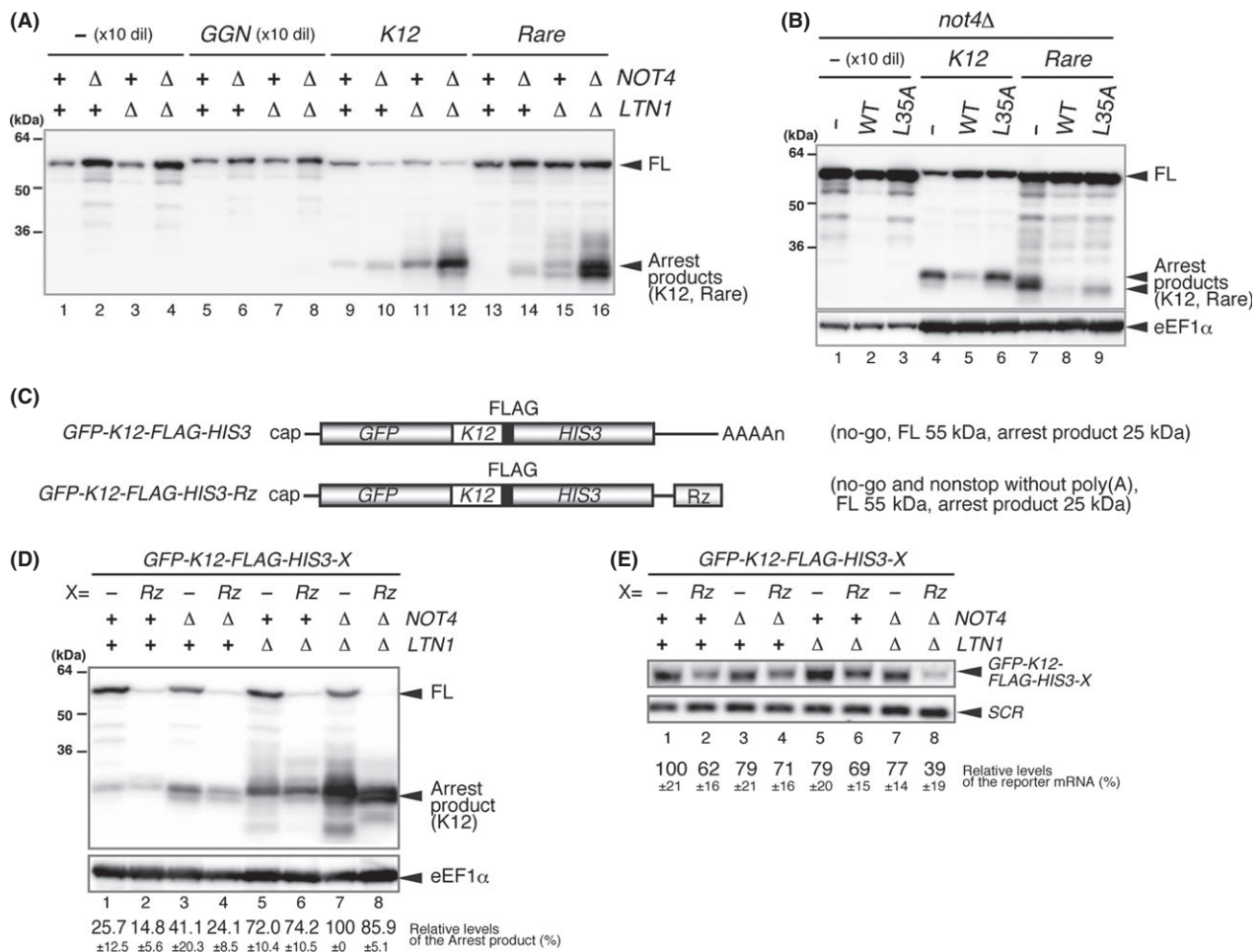


Figure 3 Substrate specificity of the two ubiquitin ligases in protein degradation coupled to translation arrest. (A) Wild-type, *not4Δ* mutant, *ltn1Δ* mutant and *ltn1Δnot4Δ* mutant cells containing the indicated reporter genes were grown in SC-Glu Ura medium, and protein samples were analyzed as in Fig. 1B. (B) The binding of Not4 to the E2 enzyme is required for the down-regulation of arrest products. W303*not4Δ* mutant cells containing *GFP-FLAG-HIS3* (-), *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3* (K12) or *GFP-rare codons-FLAG-HIS3* (Rare) reporter genes were transformed with plasmids expressing Not4 wild-type (WT) or Not4L35A mutant protein (L35A) defective in binding to the E2 enzyme or control plasmid (-). Protein samples were prepared, and the levels of arrest products were determined by Western blotting with anti-GFP (Top panel) or anti-EF-1α antibodies (Bottom panel). When indicated, protein samples were diluted 10-fold. (C) Schematic drawing of the *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3* and *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3-Rz* reporter mRNAs. The filled boxes indicate the open reading frames, the lines represent nontranslated regions, and the tract of As denotes the poly(A) tail. The dark box shows the FLAG tag sequences, and Rz indicates the hammerhead ribozyme sequence that induces self-cleavage. (D) The poly(A) tail is not required for the degradation of arrest products by Not4. Indicated yeast cells containing the *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3* (-) or *GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3-Rz* (-Rz) reporter genes were grown in SC-Glu Ura medium, and protein samples were analyzed as in Fig. 1B. (E) The levels of reporter mRNAs were not affected in the indicated mutants. The relative levels of reporter mRNAs were determined by Northern blotting using DIG-labeled *GFP* or *SCR1* probes, as described previously (Tsuboi *et al.* 2012).

middle panel). These results indicate that Ltn1 acts upstream of Cdc48, which is consistent with the hypothesis that, in the degradation of arrest products, Ltn1 may ubiquitinate peptidyl-tRNA on the 60S ribosome and that the proteasome degrades aberrant

polypeptides from the carboxyl terminus after release from the tRNA. These results also suggest that Cdc48 may be required for unfolding of the GFP moiety of the aberrant protein for complete degradation by the proteasome.

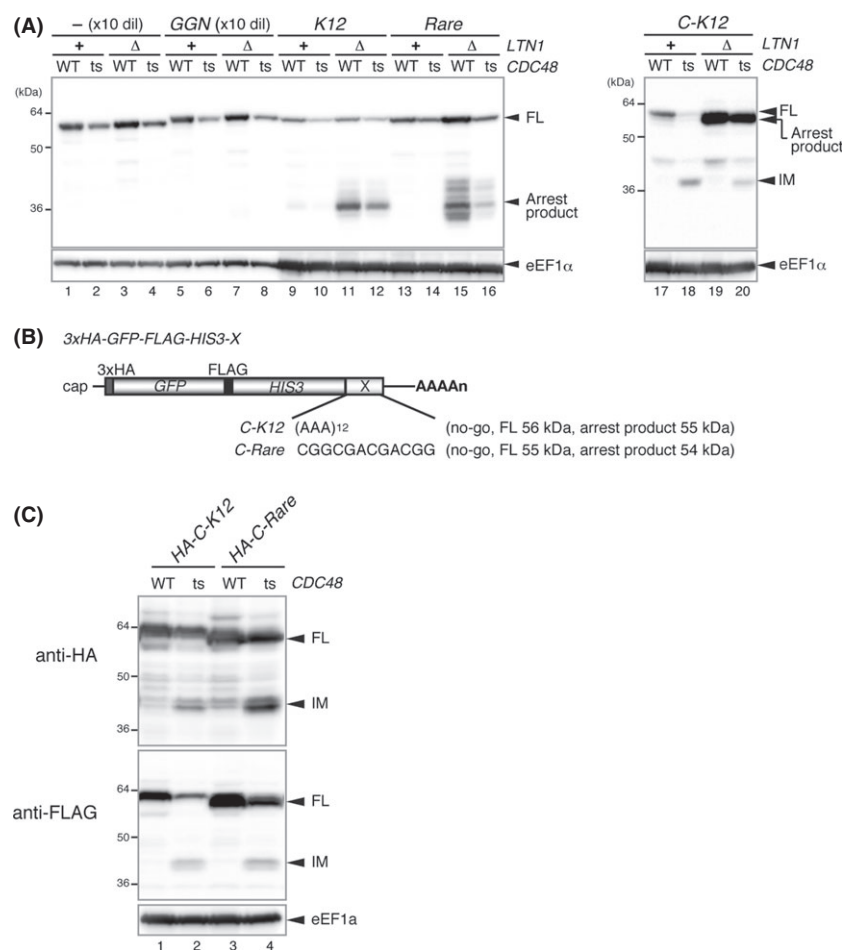


Figure 4 Ltn1-dependent degradation of aberrant proteins is triggered from the carboxyl terminus. (A) Wild-type, *cdc48-3*, *ltn1* Δ and *ltn1* Δ *cdc48-3* cells were transformed with the indicated reporter genes and grown in SC-Glu Ura medium at the permissive temperature of 25 °C. Protein samples were analyzed as in Fig. 1B. When indicated, protein samples were diluted 10-fold. (B) Schematic drawing of the *C-K12* (*3HA-GFP-FLAG-HIS3-K12(AAA)*) and *C-Rare* (*3HA-GFP-FLAG-HIS3-rare codons*) reporter mRNAs for detecting the degradation intermediates stabilized in the *cdc48-3* temperature-sensitive mutant. The filled boxes indicate the open reading frames, the lines represent nontranslated regions, and the tract of As denotes the poly(A) tail. Two dark boxes show the HA and FLAG tag sequences, and X indicates the translation arrest-inducing sequences containing K12 or Rare. (C) The degradation intermediates stabilized in the *cdc48* temperature-sensitive mutant contained the entire GFP region. Wild-type and *cdc48-3* mutant cells were transformed with p416GPDp-*3HA-GFP-FLAG-HIS3-K12(AAA)* (*HA-C-K12*) or p416GPDp-*3HA-GFP-FLAG-HIS3-rare codons* (*HA-C-Rare*). Cells were grown in SC-Glu Ura medium at 25 °C, and protein samples were analyzed by Western blotting with anti-HA (top panel) anti-FLAG (middle panel) or anti-eEF-1 α (bottom panel) antibodies.

Discussion

Previous studies have showed that mRNA quality control systems stimulate the degradation of aberrant mRNA to prevent the potentially harmful products derived from aberrant mRNAs. Recent studies on quality control systems induced by abnormal translation elongation and termination have revealed that both aberrant mRNAs and proteins are subjected to rapid degradation (Ito-Harashima *et al.* 2007;

Dimitrova *et al.* 2009; Bengtson & Joazeiro 2010; Kuroha *et al.* 2010; Brandman *et al.* 2012; Defenouillere *et al.* 2013; Shao *et al.* 2013; Verma *et al.* 2013). In this study, we examined the mechanism of co-translational degradation of aberrant proteins by the proteasome, as well as the roles of two E3 ubiquitin ligases, ribosome-stalling factor RACK1/ASC1 and the stalled ribosome dissociation factor Dom34: Hbs1. Our results strongly suggest that Ltn1 and

Not4 have synergistic effects on the degradation of arrest products (Fig. 3) and that the poly(A) tail may not be required for the degradation of arrest products by these two ligases (Figs 1,3). Ltn1 plays a crucial role in the degradation of arrest products derived from mRNAs containing arrest-inducing sequences, including polybasic amino acid sequences and rare codons (Fig. 2). Furthermore, Ltn1 may recognize peptidyl-tRNA on stalled ribosomes and ubiquitinate this complex for degradation by the proteasome. In contrast, Not4 may bind to the 80S ribosome that is stalled within the mRNA, but not at the 3' end of the mRNA, which is consistent with the ribosome binding specificity of these ligases, as Not4 is found in the polysome fractions (Dimitrova *et al.* 2009) and Ltn1 is mainly distributed in the 60S subunit (Bengtson & Joazeiro 2010; Brandman *et al.* 2012). We did not directly detect ubiquitination of aberrant proteins on polysomes. Therefore, whether Ltn1 ubiquitinates polypeptides from aberrant mRNAs before or after peptidyl-tRNA hydrolysis is still unknown. Based on these results, we have proposed models for the degradation of arrest products. When a ribosome is stalled within mRNA during translation elongation in a RACK1/ASC1-dependent manner, it is dissociated, and Ltn1 may ubiquitinate the peptidyl-tRNA on the 60S subunit or the peptide released from tRNA. Moreover, Ltn1 and Not4 have synergistic effects on the degradation of arrest products, and Not4 may bind to the stalled 80S ribosome, but not to the 60S subunit containing the peptidyl-tRNA.

Translation arrest due to poly-arginine sequences or tandem rare codons was defective in the *RACK1/ASC1* mutant (Fig. 2) (Kuroha *et al.* 2010). Moreover, the level of the protein products derived from the reporter gene containing poly-lysine sequences within the ORF was drastically increased in the *RACK1/ASC1* deletion mutant, whereas the levels of arrest products were significantly decreased in the *RACK1/ASC1* deletion mutant even in the absence of Ltn1 (Fig. 2). The precise mechanism by which RACK1/ASC1 induces translation arrest by two different *dis*-elements, including specific nascent peptide sequences and a low abundance of aminoacyl-tRNA, has largely remained unknown. However, 40S-bound RACK1/ASC1 is important for regulating translation by sensing aberrant elongation reactions. In addition, RACK1/ASC1 makes extensive contacts with the phosphate backbone and bases of h39 and h40 of 18S rRNA (Rabl *et al.* 2011). RACK1/ASC1 is also associated with rpS16e, S17e and S3e over a large contact surface (Rabl *et al.* 2011), and these ribosome pro-

teins near the exit tunnel of the 40S subunit play crucial roles in the fidelity of translation elongation. Therefore, translation defects in *RACK1/ASC1* mutants must be investigated to understand the precise function of RACK1/ASC1 in translation arrest induced by specific *dis*-elements.

Dom34:Hbs1 stimulates the decay of nonstop mRNAs and 5' NGD intermediates by dissociating ribosomes that are stalled at the 3' end of the mRNA and plays an important role in NSD and NGD (Tsuboi *et al.* 2012). The results in this study showed that both Not4 and Ltn1 are involved in the degradation of arrest products associated with RACK1/ASC1-dependent translation arrest, whereas the Dom34:Hbs1 complex is only minimally involved in the rapid degradation of arrest products. When a ribosome is stalled within an mRNA during translation elongation, it may be dissociated in a Dom34:Hbs1-independent manner. Subsequently, the peptidyl-tRNA on the 60S subunit is ubiquitinated by Ltn1, leading to degradation by the proteasome. In contrast to ribosome stalling within the mRNA, when the ribosome is stalled at the 3' end of aberrant mRNAs lacking a termination codon, there are two potential consequences (Fig. S2 in Supporting Information). First, the Dom34:Hbs1 complex may bind to an empty A-site and stimulate dissociation of the ribosome, leading to the rapid degradation of aberrant mRNAs, as previously reported (Tsuboi *et al.* 2012). The GTPase activity of Hbs1 is stimulated by ribosome and induces the release of Hbs1 from Dom34/Pelota that is required for the split of ribosome by main ribosome-recycling factor Rli1/ABCE1 (Pisarev *et al.* 2010; Shoemaker *et al.* 2010; Pisareva *et al.* 2011; Shoemaker & Green 2011; Becker *et al.* 2012). Rli1/ABCE1 interacts with carboxyl-terminal domain of Dom34/Pelota and splits 80S ribosome into subunits in an ATP hydrolysis-dependent manner *in vitro* (Pisareva *et al.* 2011; Shoemaker & Green 2011; Becker *et al.* 2012). During subunit dissociation by the Dom34:Hbs1 complex, the polypeptide may be released from the tRNA, but not subjected to ubiquitination by Ltn1. In the alternative pathway, the stalled ribosome may be dissociated into the 40S subunit and the 60S subunit containing the peptidyl-tRNA. Then, the peptidyl-tRNA on the 60S subunit may be subjected to Ltn1-dependent ubiquitination and degraded by the proteasome. The protein quality control system for nonstop products produced from nonstop mRNA containing a poly(A) tail differs from that associated with the degradation of aberrant nonstop proteins produced from stop codon-less mRNA

lacking a poly(A) tail. Translation of a poly(A) tail induces strong translation arrest (Inada & Aiba 2005; Ito-Harashima *et al.* 2007). However, some populations of ribosomes may be stalled at the 3' end of mRNA, dissociated by Dom34:Hbs1 and degraded by the exosome. Moreover, neither Not4 nor RACK1/ASC1 is essential for the degradation of nonstop proteins derived from nonstop mRNA (Dimitrova *et al.* 2009; Kuroha *et al.* 2010). We did not directly detect ubiquitination of aberrant proteins derived from *GFP-Rz* mRNA on polysomes (Fig. 1E), and there are two possibilities that Ltn1 may ubiquitinate peptidyl-tRNAs and/or peptides released from the peptidyl-tRNAs derived from nonstop mRNA lacking a termination codon.

Cdc48/p97 promotes the degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome (Brandman *et al.* 2012; Verma *et al.* 2013). It has been showed that the ubiquitinated proteins were accumulated and associated with ribosomes, and *cdc48-3* cells accumulated even peptidyl-tRNAs of the nonstop mRNA with poly(A). This seems to be inconsistent with the fact that Ltn1, acting upstream of Cdc48, accumulate polypeptides but not peptidyl-tRNAs from nonstop mRNAs without poly(A) in Fig. 1C. One possibility is that this is due to the condition of the harvest. In Verma *et al.*'s study, *cdc48-3* ts cells were harvested after the 2-h growth at restricted temperature. In contrast, we have harvested *cdc48-3* cells grown at permissive temperature and might show the less severe defects than that at restricted temperature. The other possibility is that Ltn1 acts on peptidyl-tRNAs and polypeptides derived from aberrant mRNAs differently according to the existence of poly(A) on the mRNAs. Indeed, Cdc48 is also required for efficient degradation of a approximately 30 kDa intermediate without the C-terminal region of C-K12, whose mRNA is not only an arrested mRNA but also a mimic of a non-stop mRNA with poly(A). These suggest that Cdc48 may have several action points in degradation of translation products from arrested mRNA. Although the mechanism by which E3 ubiquitin ligases recognize stalled ribosomes remains to be resolved, it is clear that nascent peptides are subjected to different protein quality control systems and that improper translation elongation is sufficient to induce degradation. Our results suggest that Cdc48 may unfold aberrant proteins for efficient proteasome-dependent degradation in the degradation of arrest products and aberrant nonstop proteins. We propose that Cdc48 may play two roles in protein quality control systems coupled to aberrant translation: dissoci-

ation of the peptidyl-tRNA on the 60S subunit and unfolding of aberrant proteins derived from aberrant mRNAs. Further experiments are needed to make clear the function of Cdc48 in the degradation of arrest products derived from various aberrant mRNAs.

Experimental procedures

Strains and plasmids

The yeast strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 (Supporting Information), and the oligonucleotides used for plasmid construction are described in Table S2 (Supporting Information).

Detection of peptidyl-tRNA

Peptidyl-tRNA was detected using cell extracts and polysome fractions using NuPAGE followed by Western blotting as described previously (Tsuboi *et al.* 2012). To destroy the RNA moiety of peptidyl-tRNA, RNase A was added to the samples at a final concentration of 10 µg/ml and was incubated at 37 °C for 10 min.

Polysome analysis

Yeast cells were grown exponentially at 30 °C and harvested by centrifugation. Cell extracts were prepared as described previously (Inada & Aiba 2005). The equivalent of 50 A₂₆₀ units was then layered onto linear 10%–50% sucrose density gradients. Sucrose gradients (10%–50% sucrose in 10 mM Tris-acetate pH 7.4, 70 mM ammonium acetate, 4 mM magnesium acetate) were prepared in 25 × 89 mm polyallomer tubes (Beckman Coulter) using a gradient master. Crude extracts were layered on top of the sucrose gradients and then centrifuged at 150 000 *g* in a P28S rotor (Hitachi Koki, Japan) for 2.5 h at 4 °C. Gradients were then fractionated (TOWA lab, Tsukuba), and polysome profiles were generated by continuous absorbance measurements at 254 nm using a single path UV-1 optical unit (ATTO Biomini UV-monitor) connected to a chart recorder (ATTO, digital mini-recorder). Fractions of equal volume were collected and processed for NuPAGE followed by Western blotting, as described above.

Plasmid construction

Plasmids expressing various Ltn1 proteins were constructed as follows. To construct pIT2125 (p415GPDp-HA-FLAG), a *SpeI-XhoI* fragment of *HA-LTN1* was amplified by PCR using the two primers OKK228 and OKK229, and this product was then inserted into the *SpeI-XhoI* sites of p415ADHp. To construct pIT2126 (p415GPDp-HA-LTN1ΔRING) or pIT2127 (p415GPDp-HA-LTN1-W1542E), mutations were introduced by site-directed mutagenesis using the primers listed in Table

S2 (Supporting Information). To construct pIT2128 (p415GPDp-LTN1-FLAG), pIT2129 (p415GPDp-LTN1 Δ RING-FLAG) or pIT2130 (p415GPDp-LTN1-W1542E-FLAG), *SpeI*-*XhoI* fragments of pIT2125 (p415GPDp-HA-FLAG), pIT2126 (p415GPDp-HA-LTN1 Δ RING) or pIT2127 (p415GPDp-HA-LTN1-W1542E) were amplified by PCR using the two primers OIT1802 and OIT1884, and the product was then inserted into the *SpeI*-*XhoI* sites of p415ADHp.

To construct the pIT2131 (p416GPD-GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3-Rz) reporter, the hammerhead ribozyme sequence (Rz) was inserted into pIT2051 (pGPDp-GFP-K12(AAA)-FLAG-HIS3) by site-directed mutagenesis using the primers listed in Table S2 (Supporting Information).

To construct pIT2132 (p416GPD-GFP(BH Δ)-FLAG-HIS3), mutations to disrupt the *Bam*HI site were introduced into pSA144 (pGPDp-GFP-FLAG-HIS3-CYC1ter) by site-directed mutagenesis using the primers listed in Table S2 (Supporting Information). The two oligonucleotides OKK80 and OKK81 were annealed and inserted into the *Xba*I site of pIT2132 to create the pIT2133 (p416GPD-3HA-GFP(BH Δ)-FLAG-HIS3) reporter. The two oligonucleotides OIT980 and OIT981 were annealed and inserted into the *Spe*I site of pIT2133 to create pIT2134 (p416GPD-3HA-GFP(BH Δ)-K12(AAA)-FLAG-HIS3). The two oligonucleotides OIT431 and OIT432 were annealed and inserted into the *Spe*I site of pIT2133 to create pIT2135 (p416GPD-3HA-GFP(BH Δ)-rare-FLAG-HIS3). The two oligonucleotides OIT1181 and OIT1182 were annealed and inserted into the *Spe*I site of pIT2133 to create pIT2136 (p416GPD-3HA-GFP(BH Δ)-Rz-FLAG-HIS3). The two oligonucleotides OIT2147 and OIT2148 were annealed and inserted into the *Bam*HI site of pIT2133 to create pIT2137 (p416GPD-3HA-GFP(BH Δ)-FLAG-HIS3-K12(AAA)). The two oligonucleotides OIT2145 and OIT2146 were annealed and inserted into the *Bam*HI site of pIT2134 to create pIT2138 (p416GPD-3HA-GFP(BH Δ)-FLAG-HIS3-rare).

Acknowledgements

The authors thank Dr Kunio Nakatsukasa and Dr Takumi Kamura for the yeast strains, plasmids and valuable discussion and comments. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas of 'RNA regulation' (No. 20112006) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (to T.I.). The authors appreciate constructive discussion with Dr Onn Brandman and Dr Jonathan Weissman.

References

- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y.C., Collart, M.A., Liu, H.Y. & Denis, C.L. (1999) The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6642–6651.
- Bebeacua, C., Forster, A., McKeown, C., Meyer, H.H., Zhang, X. & Freemont, P.S. (2012) Distinct conformations of the protein complex p97-Ufd1-Npl4 revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 1098–1103.
- Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C.J., Anger, A.M., Armache, J.P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., Karcher, A., Thomm, M., Hopfner, K.P., Green, R. & Beckmann, R. (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**, 501–506.
- Bengtson, M.H. & Joazeiro, C.A. (2010) Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* **467**, 470–473.
- Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., Dunn, J.G., Rouskin, S., Inada, T., Frost, A. & Weissman, J.S. (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042–1054.
- Chen, L., Muhrlad, D., Haurlyuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R. & Song, H. (2010) Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1233–1240.
- Defenouillere, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A. & Fromont-Racine, M. (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 5046–5051.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. (2009) Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **284**, 10343–10352.
- Doma, M.K. & Parker, R. (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564.
- Duttler, S., Pechmann, S. & Frydman, J. (2013) Principles of cotranslational ubiquitination and quality control at the ribosome. *Mol. Cell* **50**, 379–393.
- van den Elzen, A.M., Henri, J., Lazar, N., Gas, M.E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., van Tilbeurgh, H., Seraphin, B. & Graille, M. (2010) Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1446–1452.
- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrero, A.L., Parker, R. & Dietz, H.C. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258–2261.
- Gandhi, R., Manzoor, M. & Hudak, K.A. (2008) Depurination of Brome mosaic virus RNA3 *in vivo* results in translation-dependent accelerated degradation of the viral RNA. *J. Biol. Chem.* **283**, 32218–32228.
- van Hoof, A. & Parker, R. (2002) Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr. Biol.* **12**, R285–R287.

- Inada, T. & Aiba, H. (2005) Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* **24**, 1584–1595.
- Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. (2007) Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* **21**, 519–524.
- Izawa, T., Tsuboi, T., Kuroha, K., Inada, T., Nishikawa, S. & Endo, T. (2012) Roles of dom34:Hbs1 in nonstop protein clearance from translocators for normal organelle protein influx. *Cell Rep.* **2**, 447–453.
- Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T. & Nureki, O. (2010) Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1alpha complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 17575–17579.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K. & Inada, T. (2010) Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* **11**, 956–961.
- Letzring, D.P., Wolf, A.S., Brule, C.E. & Grayhack, E.J. (2013) Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA* **19**, 1208–1217.
- Meyer, H. (2012) p97 complexes as signal integration hubs. *BMC Biol.* **10**, 48.
- Mulder, K.W., Inagaki, A., Cameroni, E., Mousson, F., Winkler, G.S., De Virgilio, C., Collart, M.A. & Timmers, H.T. (2007) Modulation of Ubc4p/Ubc5p-mediated stress responses by the RING-finger-dependent ubiquitin-protein ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**, 181–192.
- Panasenko, O., Landrieux, E., Feuermann, M., Finka, A., Paquet, N. & Collart, M.A. (2006) The yeast Ccr4-Not complex controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 31389–31398.
- Panasenko, O.O. & Collart, M.A. (2012) Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Mol. Microbiol.* **83**, 640–653.
- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U. & Pestova, T.V. (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* **37**, 196–210.
- Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U., Pestova, T.V. & Pisarev, A.V. (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* **30**, 1804–1817.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A. & Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* **331**, 730–736.
- Shao, S., von der Malsburg, K. & Hegde, R.S. (2013) Listerin-dependent nascent protein ubiquitination relies on ribosome subunit dissociation. *Mol. Cell* **50**, 637–648.
- Shoemaker, C.J., Eyler, D.E. & Green, R. (2010) Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* **330**, 369–372.
- Shoemaker, C.J. & Green, R. (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, E1392–E1398.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I. & Inada, T. (2012) Dom34:Hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* **46**, 518–529.
- Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J. & Deshaies, R.J. (2013) Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *ELife* **2**, e00308.
- Wilson, M.A., Meaux, S. & van Hoof, A. (2007) A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics* **177**, 773–784.

Received: 10 February 2013

Accepted: 19 September 2013

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Figure S1 The levels of Ltn1 and Not4 mutant proteins.

Figure S2 Protein quality control systems associated with nonstop mRNA surveillance in yeast.

Table S1 Yeast strains and plasmids used in this study

Table S2 List of oligonucleotides primers used for plasmid construction

